

明細書

架橋多糖微粒子およびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、薬物、特に薬効を有するタンパク質またはペプチドを徐放する架橋多糖薬物徐放微粒子担体、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、薬効を持つタンパク質、ペプチドの製剤が盛んに実用化されているが、一般にこうした薬物は血中半減期が短く、またその大部分が頻回投与の注射剤であるため、薬剤投与における患者の負担は過大なものとなっている。したがって、できるだけ少量で薬効を発揮させ且つ投与回数も少なくできる、タンパク質またはペプチド薬剤の実用的な徐放型製剤が望まれている。

[0003] 薬効を持つタンパク質またはペプチドの徐放製剤においては、製剤調製時または徐放中の、タンパク質またはペプチドの変性あるいは凝集による回収率低下が、実用化への大きな障害となっている。ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)等の生分解性高分子を基材にした徐放製剤が試みられているが、基材の疎水性、乾燥工程、pHの低下に起因するタンパク質の変性、凝集が報告されている(非特許文献1および2を参照)。一方、こうした問題が低減される親水性のハイドロゲルを基材に用いた徐放製剤も報告されているが、やはり実用化には至っていない。また、安全性の面からは、徐放基材として用いる素材は、非抗原性、非変異原性、無毒性、生分解性を併せ持つものでなければならず、タンパク質またはペプチドの封入率、回収率および安全性の全てにおいて、実用化レベルに達している徐放型製剤の実現は難しい。

[0004] 近年、多糖を薬物担体の基材として用いるという報告もある。その中でも、ヒアルロン酸(HA)は、1934年、K. Meyerによって牛の眼の硝子体から単離された生体材料(多糖)であり、細胞外マトリックスの主成分として古くから知られている。HAは、D-グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとが β (1→3)グリコシド結合により連結された二糖単位から成るグルコサミドグリカンの一種である。

[0005] HAは、化学的、物理的構造に種差が無く、ヒトも代謝系を持っており、免疫性、毒性といった面でも最も安全な医用生体材料(Biomaterial)の一つである。近年、微生物による高分子量HAの大量生産が可能となり、変形性軟骨治療薬、化粧品等の分野でも実用化されている。

[0006] HAを基材に用いた架橋方法、HAゲルからのタンパク質やペプチド薬物の徐放も多数報告されている。HAを化学架橋でゲル化させる方法としては、カルボジイミド法(特許文献1参照)、ジビニルスルフォン法(特許文献2参照)、グリシジルエーテル法(特許文献3参照)等が知られている。一般に、ゲル中にタンパク質またはペプチドを封入する場合は、架橋後にタンパク質またはペプチドを導入する方法では、HAとタンパク質またはペプチドとの相溶性、静電反発等の問題でその導入率は低い。一方でタンパク質またはペプチド存在下で、in situ架橋を行う方法には、高封入率でタンパク質またはペプチドを担持させられる利点がある。こうしたin situ架橋により、HAゲル中にタンパク質またはペプチドを封入し、徐放させる製剤について報告されている(例えば、特許文献4参照)。しかし、こうした方法を用いてタンパク質またはペプチド存在下でHAをin situ架橋することにより得られる徐放型製剤は、回収率の点で問題を有している。例えば、ヒドラジド基(HZ)を導入したHA誘導体(HA-HZ)をN-ハイドロキシスクシンイミド(NHS)からなる架橋剤で架橋する方法(特許文献5参照)が報告されており、ここでは生理条件下でのin situ架橋を目的としてpH7.4～pH8.5で架橋形成反応を行っているが、この方法で得られるHAゲルからのタンパク質またはペプチドの回収率もやはり低いことが本発明者らの検討により確認されている。この原因是、架橋反応中にタンパク質またはペプチドの一部(主にアミノ基)が架橋剤と反応し、タンパク質が架橋してしまう点にある。またゲル中に残った変性したタンパク質またはペプチドは生物活性が低下しており、むしろ抗原性発現の原因になる等の問題がある。封入した薬物が高回収率で放出されることは、医薬品として必須の条件であるにもかかわらず、タンパク質またはペプチドを反応させずにHAを化学架橋、ゲル化させる方法は知られていない。また、高回収率でタンパク質ペプチドを封入する方法として、ポリエチレングリコール(PEG)を基材に不飽和官能基を求核付加反応で架橋する報告もあるが(特許文献6参照)、生分解性でないPEG断片が

残存する問題がある。

[0007] また、実際、こうした薬物徐放性物質を注射可能な製剤とするには、これを微粒子化する必要がある。こうした検討にスプレードライヤーは広く使用されており、インシュリン(非特許文献3、非特許文献4参照)、rh抗IgE抗体(非特許文献5参照)を微粒子化した報告、ヒアルロン酸の微粒子中に薬物を封入した報告(特許文献7参照、特許文献8)はあるが、共に短時間に皮下で溶解してしまうため薬物徐放期間は非常に短く、徐放目的としての実用性は低い。また、スプレードライ中にキトサンの架橋反応を行い、低分子薬物を封入する報告(非特許文献6参照)もあるが、放出期間は数分と短く、架橋剤に用いるアルデヒドがアミノ基などの官能基と高い反応性を有するため、タンパク質、ペプチド、その他のアミノ基などの官能基を有する低分子薬物には使用することができない。

特許文献1:国際公開 WO94/02517号パンフレット

特許文献2:特開昭61-138601号公報

特許文献3:特開平5-140201号公報

特許文献4:米国特許第5827937号明細書

特許文献5:国際公開 WO95/15168号パンフレット

特許文献6:国際公開 WO00/44808号パンフレット

特許文献7:特許第3445283号公報

特許文献8:国際公開 WO96/18647号パンフレット

非特許文献1:J. Pharm. Sci. 第88巻、第166-173頁、1999年

非特許文献2:J. Microencapsulation 第15巻、第699-713頁、1998年

非特許文献3:Int. J. Pharm. 233, 227-237, 2002年

非特許文献4:J. Control. Rel. 91, 385-394, 2003年

非特許文献5:Biotech. and Bioeng. 60, 301-309, 1998年

非特許文献6:Int. J. Pharm. 187, 53-65, 1999年

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 上述した如く、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままin si

tuで化学架橋、乾燥、微粒子化し、薬物を封入することで、高封入率、高回収率、安全性を満たすインジェクタブルな生分解性ゲル微粒子の調製方法、これを用いたタンパク質またはペプチド等の長期薬物徐放製剤は知られていない。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、かかる課題を解決する為に銳意研究を進めたところ、架橋形成反応が可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体と薬物との溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中にHA間に架橋反応を起こさせ、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入することで、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらを効率よく封入できることを見出した。また、この方法により得られた架橋ヒアルロン酸微粒子はインジェクタブルであり、生分解性で安全な長期薬物徐放微粒子担体としてタンパク質またはペプチド等の薬物を封入するのに最適であることを見出し、本発明を完成させた。

[0010] すなわち、本発明は、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらを *in situ* で架橋、微粒子形成、および乾燥することにより得られる、ゲル中に封入したインジェクタブルなタンパク質またはペプチド等の薬物徐放製剤、及びその製造方法に関する。

[0011] すなわち本発明の一つの側面によれば、架橋多糖微粒子の製造方法であって、
a) 架橋可能な官能基を有する多糖誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該多糖誘導体の架橋反応を進行させる工程を含む前記製造方法が提供される。さらに本発明の別の側面によれば、前記工程b)が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、前記製造方法が提供される。

[0012] 本発明のさらにその他の側面によれば、前記製造方法により調製することができる架橋多糖微粒子もまた提供される。

[0013] 以下、本発明を更に具体的に説明する。

[0014] 本発明で用いられる多糖誘導体は、架橋反応可能な官能基を有する多糖誘導体であれば特に制限されないが、好ましくは、グリコサミドグリカン(酸性ムコ多糖；例え

ば、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン4-硫酸、コンドロイチン6-硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸など)の誘導体のうち架橋反応可能な官能基を有するものであり、特に好ましくは、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体である。

[0015] 従って、本発明のさらに別の側面によれば、架橋ヒアルロン酸微粒子の製造方法であって、

a) 架橋可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該ヒアルロン酸誘導体の架橋反応を進行させる工程を含む前記製造方法が提供される。さらに本発明の別の側面によれば、前記工程b)が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、前記製造方法が提供される。また、本発明のさらにその他の側面によれば、前記製造方法により調製することができる架橋ヒアルロン酸微粒子もまた提供される。

[0016] 本発明の工程a)における希薄溶液は、架橋反応に必要な基質および試薬などを含む溶液であるが溶媒により高度に希釈されているために反応の進行しないかまたは進行が極めて遅い溶液であり、その濃度は特に限定はされないが、例えば0.1%～5%、特に0.2%～3%である。また本発明に用いる溶媒としては、当該技術分野において通常用いられている溶媒またはそれらの混合物を用いることができ、特に限定はされないが、例えば水、DMSO、エタノール、N-メチルピロリドン、超臨界炭酸液などである。

[0017] 本発明の工程b)における希薄溶液を微粒子状の液滴に分散する方法には、当該技術分野で通常用いられる方法であれば特に限定されないが、当該希薄溶液を噴霧する方法、当該希薄溶液を別の液体と混合することによりエマルジョンを形成する方法などが含まれる。ここで微粒子状の液滴は、特に限定されないが例えば0.04μm～1.5mm、好ましくは0.1μm～500μmの平均粒子径を有することができる。

[0018] 本発明の工程c)における溶液の濃縮の方法は、架橋反応の進行をより早める濃度まで濃縮することができる手段であれば特に限定されない。また当該濃縮には、例え

ば、当該架橋反応が固相反応として進行するような溶媒が完全に除去された状態も含まれる。

[0019] なお、前記工程b)及びc)は一連の工程として行っててもよい。具体的には、前記工程b)及びc)を一連の工程として、スプレードライ、エマルション液中乾燥法、溶媒拡散法などにより行うことができる。この中でも、前記工程b)及びc)を一連の工程としてスプレードライにより行うのが好ましい。

[0020] 本発明の架橋多糖微粒子は、架橋反応可能な官能基を有する多糖誘導体を含む溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中に多糖誘導体を架橋することにより製造することができる。また、架橋反応可能な官能基を有する多糖誘導体と薬物とを含む溶液を、架橋反応の進行の遅い希薄な状態から架橋反応が進行する濃度に濃縮することで、濃縮中に架橋反応を起こさせ、架橋反応と乾燥を同時にすることで薬物を多糖架橋体中に封入した薬物担持微粒子とすることを特徴とする。

[0021] 本発明により提供される、製造方法および当該製造方法により得られた、例えば架橋ヒアルロン酸微粒子などの架橋多糖微粒子は、好ましくは以下に示す特徴を有している。

1. 完全生分解性であり、生体に対する高い安全性を確保できる。
2. HAなどの多糖に架橋形成が可能な官能基をグラフトすることで、架橋点間距離を非常に小さく(例えばHAの場合、グルクロン酸当たり33モル%グラフトで約3nm)することが可能であり、長期徐放を実現する上で有利である。
3. 高架橋密度である。
4. タンパク質を薬剤として用いる場合、タンパク質の変性を防ぐことができる。
5. 微粒子化、乾燥化、架橋化を一製造工程で行える。

[0022] 本発明でいう架橋または化学架橋とは、共有結合による、分子間または分子内架橋結合を含むものであり、同時に分子間および分子内架橋結合を有する場合もある。

[0023] 本発明で使用される架橋反応は、薬物、例えば、タンパク質やペプチドの共存下で架橋を形成しても薬物を変性させない架橋結合形成方法であれば特に限定されな

い。こうした反応としては、例えば、メルカプト基間のジスルフィド結合形成、メルカプト基と不飽和結合との間の付加反応、ヒドラジド基と活性カルボン酸エステル間の反応等が挙げられる。

[0024] 架橋時のpHは特に限定されないが、タンパク質またはペプチドを変性させずに架橋形成の促進し、タンパク質またはペプチド等の薬物の含有アミノ基との反応を防ぐpHが好ましい。そのようなpHは当業者が適宜選択することが可能であるが、例えばpH3.0～pH9.0、好ましくはpH4.5～pH9.0である。

[0025] 本発明に用いる多糖誘導体は、上記したような架橋反応が可能なものであれば特に限定されないが、具体的にはHAに架橋可能な官能基を導入したヒアルロン酸誘導体(HA誘導体)が挙げられる。本発明において用いられる架橋可能な官能基は、特に限定されないが、例えば、メルカプト基、不飽和結合を有する基(例えば、メタクリル基、アクリル基、ビニルスルфон基、アセチレンカルボニル基等)、ヒドラジド基(HZ基)等が挙げられる。

[0026] 架橋反応が、メルカプト基同士のジスルフィド結合形成に由来する場合は、例えばメルカプト基を導入したHA誘導体などの多糖誘導体のみを用いて架橋を形成することができ、もしくはこれに架橋剤としてメルカプト基を2つ以上有する化合物(例えば、ジチオトレイトール(DTT)、ブタンジチオール、ポリエチレングリコールジチオール、システインを2つ以上含むペプチド等)を添加して架橋を形成することもできる。また、架橋反応速度を高める目的で、テトラチオン酸ナトリウム(Sodium tetrathionate: STT)、ジピリジルジスルヒド(Dipyridyl disulfide)、エルマン試薬(Ellman's reagent: DTNB)等の化合物を添加しても良い。この際、未反応のメルカプト基がゲル中に残存するとタンパク質やペプチドの変性に繋がる可能性があるため、反応効率をできるだけ上げるためにこれら化合物を反応性を有するメルカプト基に対して0.1モル倍～2モル倍、さらに好ましくは0.5モル倍～1.5モル倍添加するのが好ましい。

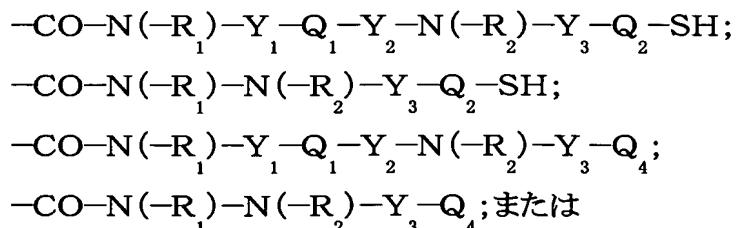
[0027] メルカプト基を導入した多糖誘導体の調製方法は、特に限定されないが、例えば、HAを3級アンモニウム塩にして、DMSO等の極性有機溶媒に溶解し、カップリング剤存在下、メルカプト基を有するアミンまたはヒドラジドと反応させる方法などにより、調製することができる。メルカプト基を有するアミンは、特に限定されないが、例えば、

2-アミノエタン-1-チオール、3-アミノプロパン-1-チオール、チオグリコール酸ヒドラジド、などを挙げることができる。

[0028] また、HAにメルカプト基を導入する場合、まずアミノ基やヒドラジド基を導入し、その後このアミノ基やヒドラジド基にメルカプト基を導入する方法も好ましい。例えばHAのカルボン酸と、アジピン酸ジヒドラジド(ADH)またはエチレンジアミン、エチレンジオキシビスエチルアミン等の2価のHZまたはアミノ基含有化合物とをカップリング剤で縮合させ、ヒドラジド基を導入したHA誘導体(HA-HZ)またはアミノ基を導入したHA誘導体(HA-アミノ基)を合成し、これに例えばN-スクシンイミジル 3-[2-ピリジルジチオ]プロピオネート(SPDP)を反応させ、DTT等の還元剤で還元、メルカプト基とする方法、あるいは2-イミノチオラン(Trout's Reagent)をヒドラジド基、あるいはアミノ基と反応させる方法などが挙げられる。

[0029] カップリング剤としては、例えば、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(BOP)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、N, N'-カルボニルジイミダゾール(CDI)、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、EDC/3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン(HODhbt)、N-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1, 2-ジヒドロキノリン(EEDQ)、4-(4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリウム クロリド n-水和物(DMT-MM)、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム テトラフルオロボレート(TBTU)等を挙げることができる。

[0030] 本発明における架橋可能な官能基は、例えば多糖の分子内に含まれるカルボキシル基を以下のようなメルカプト基、不飽和結合、アミノ基またはヒドラジル基を含むエステル基もしくは置換アミド基に変換することにより導入することができる:



$-\text{CO}-\text{N}(-\text{R}_1)-\text{Y}_1-\text{Q}-\text{Y}_2-\text{NH}_2;$

(式中、 R_1 は、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

Y_1 は、単結合、 $-\text{N}(-\text{R}_3)\text{CO}-$ 、 $-\text{N}(-\text{R}_3)-$ 、 $-\text{CO}-$ 、または $-\text{CH}_2\text{CO}-$ であり、

Y_2 は、単結合、 $-\text{CON}(-\text{R}_4)-$ 、または $-\text{N}(-\text{R}_4)-$ であり、

Q は、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキレン基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

R_2 、 R_3 および R_4 は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

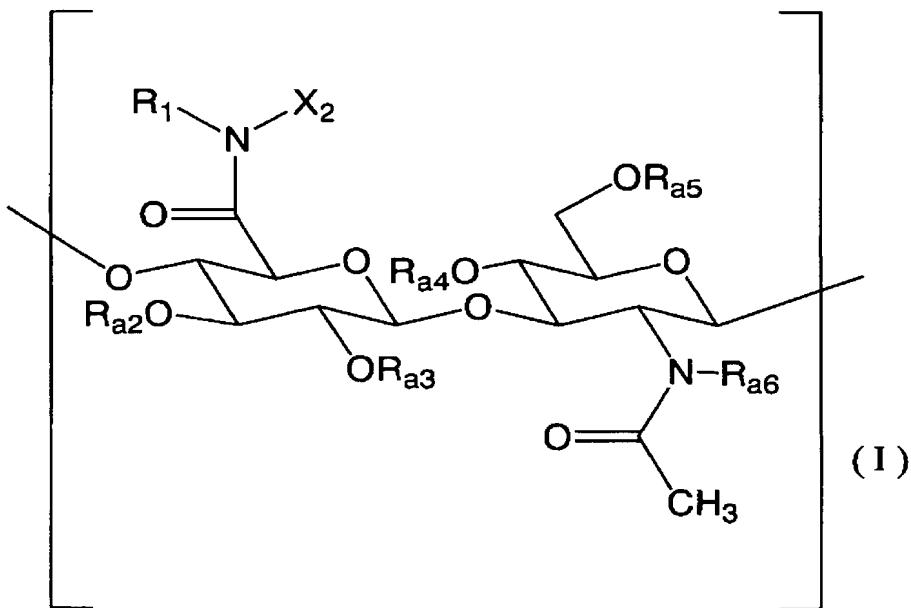
Y_3 は、単結合、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-$ 、または $-\text{CONH}-$ であり、

Q_2 は、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキレン基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

Q_4 は、直鎖もしくは分枝 C_{2-10} アルケニル基、または、直鎖もしくは分枝 C_{2-10} アルキニル基である。)。

[0031] メルカプト基を導入した多糖誘導体の例には、好ましくは式(I)：

[0032] [化1]



[0033] (式中、 X_2 は、 $-Y_1-Q_1-Y_2-N(-R_2)-Y_3-Q_2-SH$ 、または $-N(-R_2)-Y_3-Q_2-SH$ であり、

R_1 は、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

R_{a2} 、 R_{a3} 、 R_{a4} 、 R_{a5} および R_{a6} は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルケニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキルカルボニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルケニルカルボニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキニルカルボニル基、または $-SO_2OH$ であり、

Y_1 は、単結合、 $-N(-R_3)CO-$ 、 $-N(-R_3)-$ 、 $-CO-$ 、または $-CH_2CO-$ であり、

Y_2 は、単結合、 $-CON(-R_4)-$ 、または $-N(-R_4)-$ であり、

Q_1 は、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキレン基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

R_2 、 R_3 および R_4 は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペ

チド基、またはポリエステル基である。

[0034] Y_3 は、単結合、 $-CO-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-CH_2-CH(OH)-$ 、または $-CONH-$ であり、 Q_2 は、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキレン基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基である。) で示される繰り返し構造を、少なくとも1以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体が含まれる。

[0035] また式(I)中、ポリアルキレンオキサイド基とは、 $-(CH(-R)CH_2O)_n-H$ (式中、R は水素原子、または C_{1-5} アルキル基)で示される基であり、好ましくは、ポリエチレンオキサイド基、ポリプロピレンオキサイド基であり、また好ましくはnは、1～20の整数である。またポリペプチド基は、特に限定されるものではないが、好ましくはアミノ酸1～20個からなるものである。またポリエステル基は、特に限定されるものではないが、好ましくはポリグリコール酸基、ポリ乳酸基である。

[0036] さらに、式(I)において、 R_1 は、好ましくは水素原子であり、 X_2 は、好ましくは $-Y_1-Q_1-Y_2-N(-R_2)-Y_3-Q_2-SH$ である。さらに式(II)において、 Y_1 は、好ましくは単結合または $-N(-R_3)-$ であり、 Y_2 は、好ましくは単結合であり、 Q_1 は、好ましくは直鎖または分枝 C_{1-4} アルキレン基である。さらに式(II)において、 R_2 および R_3 は、好ましくは水素原子であり、 Y_3 は、好ましくは $-CO-$ であり、好ましくは Q_2 は、直鎖または分枝 C_{1-4} アルキレン基である。

[0037] メルカプト基と不飽和結合との間の付加反応を架橋反応として利用する場合は、不飽和結合を有する基を導入したHA誘導体などの多糖誘導体とメルカプト基を2つ以上有する化合物(例えば、ジチオトレイトール(DTT)、ブタンジチオール、ポリエチレングリコールジチオール、システインを2つ以上含むペプチド、メルカプト基を導入したHA誘導体等)を混和してもよいし、逆に、メルカプト基を導入した多糖誘導体と不飽和結合を有する基を2つ以上有する化合物(例えば、エチレングリコールジメタクリレート、エチレンビスアクリルアミド、トリス-2-マレイミドエチルアミン、1, 8-ビスマレイミドトリエチレングリコール、1, 4-ビスマレイミジル-2, 3-ジヒドロキシブタン、不飽和結合を導入したHA誘導体等)を混和してもよい。また、この場合、架橋反応時のタンパク質またはペプチドの安定性向上、反応速度の向上の為にトリエタノールアミン

等の塩基性化合物を添加することが好ましい。この際好ましい濃度としては、 $10 \mu \text{L}/\text{mL} - 20 \mu \text{L}/\text{mL}$ である。メルカプト基を2つ以上有する化合物には、例えば、直鎖または分枝鎖の C_{2-10} アルキレンジチオール(ここでアルキレン部分は1以上の酸素原子が挿入されていてもよく、および/または1以上の水酸基で置換されていてもよい)も含まれる。

[0038] 不飽和基を導入した多糖誘導体の調製方法は、特に限定されないが、例えば、メタクリル酸グリジルエーテルや、無水メタクリル酸等をHAの水酸基に直接反応させる方法(J. Biomed. Mat. Res. 54, 115-121, 2001)では高い導入率は得難い。これは、HAが水溶液中で水素結合、疎水性相互作用による高次構造を形成し、ヒドロキシル基、カルボン酸基等の官能基の反応性が低いためと考えられる。タンパク質やペプチドの徐放期間を延ばすには、高い架橋密度が望ましい。このためには、グルクロン酸部分のカルボキシル基に置換基を導入するのが望ましい。例えば、HAを3級アンモニウム塩にして、DMSO等の極性有機溶媒に溶解し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(BOP)、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリスピロリジノホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)等のカップリング剤存在下、不飽和結合を有するアミンまたはヒドラジドと反応させる方法などにより、調製することができる。不飽和結合を有するアミンは、特に限定されないが、例えば、アリルアミン、ジアリルアミン、4-アミノ-1-ブテン、アクリルヒドラジド、メタクリルヒドラジド等を挙げることができる。

[0039] また上述の、アミノ基やヒドラジド基を導入し、その後、このアミノ基やヒドラジド基に不飽和結合を有する基を導入する方法も好ましい。例えばHAのカルボン酸と、アジピン酸ジヒドラジド(ADH)またはエチレンジアミン、エチレンジオキシビスエチルアミン等の2価のHZまたはアミノ基含有化合物とを、EDC、BOP、PyBOP等の縮合剤で縮合させ、ヒドラジド基修飾されたHA誘導体(HA-HZ)またはアミノ基修飾されたHA誘導体(HA-アミノ基)を合成し、これに不飽和結合を有するカルボン酸誘導体、例えば $\text{R}_{10}-\text{COOH}$ の酸無水物または活性化エステル(ここで、 R_{10} は直鎖または分枝 C_{2-10} アルケニル基である)、好ましくは無水メタクリル酸、N-ヒドロキシスクシンイミド

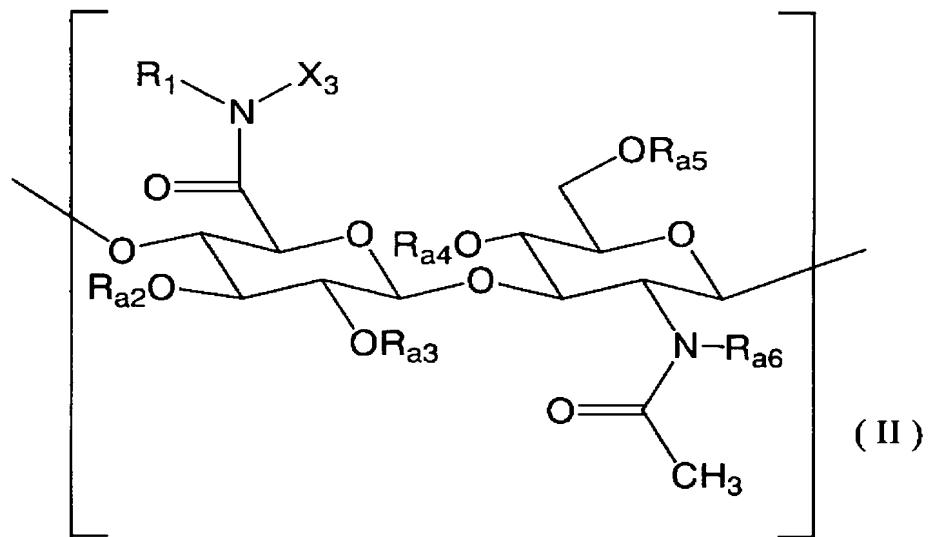
(NHS)活性化アクリル酸またはメタクリル酸等を反応させる方法などが挙げられる。

[0040] HAなどの多糖に不飽和結合を有する基を導入後、メルカプト基で架橋する場合、メルカプト基の不飽和結合を有する基に対する比率は特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能であるが、タンパク質、ペプチドとの反応を最小にし、且つ、不飽和基のゲル中の残存を防ぎ、且つ、速やかに反応させるため、メルカプト基:不飽和結合を有する基=3:1~1:2が好ましい。更に好ましくは、2:1~1:1である。

[0041] HAにメルカプト基を導入後、不飽和結合を有する基で架橋する場合、不飽和結合を有する基のメルカプト基に対する比率は特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能であるが、タンパク質、ペプチドとの反応を最小にし、且つ、不飽和基のゲル中の残存を防ぎ、且つ、速やかに反応させるため、不飽和結合を有する基:メルカプト基=3:1~1:2が好ましい。更に好ましくは、2:1~1:1である。

[0042] 不飽和結合を有する基を導入した多糖誘導体の例には、好ましくは式(II):

[0043] [化2]



[0044] (式中、 X_3 は、 $-Y_1-Q_1-Y_2-N(-R_2)-Y_3-Q_4$ 、または $-N(-R_2)-Y_3-Q_4$ であり、 R_1 は、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、

R_{a2} 、 R_{a3} 、 R_{a4} 、 R_{a5} および R_{a6} は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルケニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキルカルボニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルケニルカルボニル基、直鎖または分枝 C_{1-6} アルキニルカルボニル基、または $-SO_2OH$ であり、 Y_1 は、単結合、 $-N(-R_3)CO-$ 、 $-N(-R_3)-$ 、 $-CO-$ 、または、 $-CH_2CO-$ であり、 Y_2 は、単結合、 $-CON(-R_4)-$ 、または $-N(-R_4)-$ であり、 Y_3 は、単結合、 $-CO-$ 、または、 $-CH_2CO-$ であり、 Q_1 は、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキレン基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、 R_2 、 R_3 および R_4 は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキル基、直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、またはポリエステル基であり、 Q_4 は、直鎖もしくは分枝 C_{2-10} アルケニル基、または、直鎖もしくは分枝 C_{2-10} アルキニル基である。)

で示される繰り返し構造を、少なくとも1以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体などが含まれる。

[0045] ここで式(II)中、ポリアルキレンオキサイド基とは、 $-(CH_2(-R)CH_2O)_nH$ (式中、 R は水素原子、または C_{1-5} アルキル基)で示される基であり、好ましくは、ポリエチレンオキサイド基、ポリプロピレンオキサイド基であり、また好ましくは n は、1～20の整数である。またポリペプチド基は、特に限定されるものではないが、好ましくはアミノ酸1個～20個からなるものである。またポリエステル基は、特に限定されるものではないが、好ましくはポリグリコール酸基、ポリ乳酸基である。

[0046] さらに、式(II)において、 R は、好ましくは水素原子であり、 X_3 は、好ましくは $-Y_1-Q_1-Y_2-N(-R_2)-Y_3-Q_4$ である。さらに式(II)において、 Y_1 は、好ましくは単結合、 $-N(-R_3)CO-$ 、または、 $-N(-R_3)-$ であり、さらに好ましくは $-N(-R_3)CO-$ である。また Y_2 は、好ましくは単結合、 $-CON(-R_3)-$ であり、さらに好ましくは $-CON(-R_3)-$ であり、 Y_3 は好ましくは単結合、 $-CO-$ 、または、 $-N(-R_3)-$ であり、さらに好ましくは $-CO-$ である。さらに式(II)において、 Q_1 は好ましくは直鎖または分枝 C_{1-4} アルキ

レン基であり、 R_2 および R_3 は、好ましくは水素原子であり、 Q_4 は好ましくは直鎖または分枝 C_{2-10} アルケニル基である。

[0047] また、メルカプト基を導入した多糖誘導体の例には、上述の式(I)で示される繰り返し構造を、少なくとも1以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体などが含まれる。

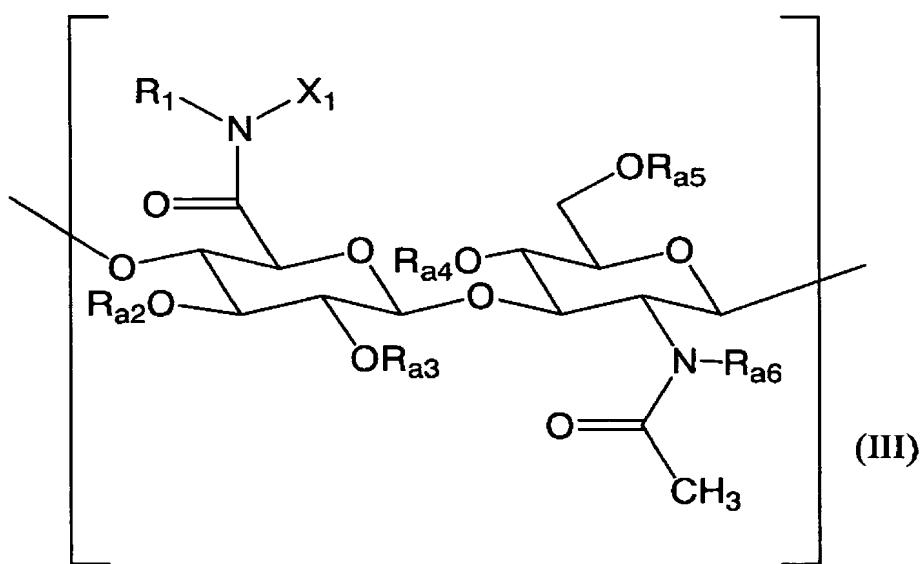
[0048] 架橋反応に、ヒドラジド基を導入したHA酸誘導体などの多糖誘導体と活性カルボン酸の反応を利用することもできる。多糖へのヒドラジド基の導入は当業者に公知の方法で行うことができ、例えばヒアルロン酸のカルボキシル基と2価のヒドラジド含有化合物(ジヒドラジド化合物)を、縮合剤を用いて縮合させることにより合成することができる。ジヒドラジド化合物としては、コハク酸ジヒドラジド、グルタル酸ジヒドラジド、アジピン酸ジヒドラジド、ピメリン酸ジヒドラジドが挙げられる。また、縮合剤としては、1, 3-ジシクロヘキシルカルボジイミド、1, 3-ジイソプロピルカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。例えば、ヒアルロン酸のカルボン酸とアジピン酸ジヒドラジド(ADH)を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)で縮合させ、ヒドラジド基で修飾されたヒアルロン酸(HA-HZ)を合成することが可能である。架橋剤としては、HZ基と反応しうる官能基であれば特に限定されないが、例えば、NHSで活性化されたエステル基、ペンタフルオロフェノキシカルボニル基、p-ニトロフェノキシカルボニル基、イミダゾリルカルボニル基、イソチオシアナト基、スルホニルクロリド基、スルホニルフルオリド基、ホルミル基、ビニルスルホニル基、酸無水物、4-ニトロフェニルホルメート基等の官能基を同一分子内に2つ以上持つ分子が挙げられる。当該架橋剤の例には、ビス[スルホスクシンイミジル]スペレート、ジスクシンイミジルグルタレート、ジスクシンイミジルタルトレート、エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシネット]などが含まれる。

[0049] アミノ基に対するHZ基との選択的反応性、タンパク質の変性等を考慮すれば、架橋時のpHは、pH3. 0～pH6. 0が好ましい。さらに好ましくは、pH4.0～pH6. 0である。架橋反応中のpHをこの範囲に保つため、用いるバッファーは揮発性の低いもの、例えばクエン酸等が好ましい。架橋剤中のヒドラジド基と反応する化合物官能基は、ゲル調製液中のヒドラジド基に対して40モル%以下であることが好ましく、さらに好ましくは20モル%以下、特に好ましくは10モル%以下である。

[0050] 架橋反応可能な官能基のHAへの導入率は、特に限定されないが、生体内で流動性のないゲルを得るためにHAのグルクロン酸当たり5モル%以上が好ましく、10モル%以上が特に好ましい。また、薬物の徐放性能は架橋されたHA誘導体の架橋密度に大きく依存するため、この導入率を制御することで薬物の徐放期間を制御することができる。

[0051] ヒドラジド基が導入された多糖酸誘導体の例には、式(III)：

[0052] [化3]



[0053] (式中、R₁ は、水素原子、直鎖または分枝C₁₋₁₀ アルキル基、直鎖または分枝C₁₋₁₀ ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、ポリエステル基であり、

X₁ は、-Y₁-Q₁-Y₂-NHNH₂ であり、

R_{a2}、R_{a3}、R_{a4}、R_{a5} およびR_{a6} は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝C₁₋₆ アルキル基、直鎖または分枝C₁₋₆ アルケニル基、直鎖または分枝C₁₋₆ アルキニル基、直鎖または分枝C₁₋₆ アルキルカルボニル基、直鎖または分枝C₁₋₆ アルケニルカルボニル基、直鎖または分枝C₁₋₆ アルキニルカルボニル基、または-SO₂OH であり、

Y₁ は、単結合、-N(-R₃)CO-、-N(-R₃)-、-CO-、または-CH₂CO- であり、

Q₁ は、単結合、直鎖または分枝C₁₋₁₀ アルキレン基、直鎖または分枝C₁₋₁₀ ヒドロキシ

アルキレン基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチド基、ポリエステル基であり、
 Y_2 は、単結合、 $-N(-R_4)CO-$ 、 $-CO-$ 、または、 $-CH_2CO-$ であり、
 R_3 および R_4 は、それぞれ独立して、水素原子、直鎖または分枝 C_{1-10} アルキル基、
直鎖または分枝 C_{1-10} ヒドロキシアルキル基、ポリアルキレンオキサイド基、ポリペプチ
ド基、ポリエステル基である。)

で示される繰り返し構造を、少なくとも1以上分子内に有するヒアルロン酸誘導体が含
まれる。

[0054] さらに、式(III)において、 R_1 は、好ましくは水素原子であり、 R_{a2} 、 R_{a3} 、 R_{a4} 、 R_{a5} およ
び R_{a6} は、好ましくは水素原子であり、 Y_1 は、好ましくは単結合、または、 $-CO-$ あり
、 Q_1 は、好ましくは直鎖または分枝 C_{1-10} アルキレン基であり、 Y_2 は、好ましくは、単結
合、または、 $-CO-$ あり、 R_3 は、好ましくは水素原子であり、 R_4 は、好ましくは水素原
子である。

[0055] また式(III)中、ポリアルキレンオキサイド基とは、 $-(CH(-R)CH_2O)_n-OH$ (式中、
Rは水素原子、または直鎖または分枝 C_{1-5} アルキル基)で示される基であり、好ましく
は、ポリエチレンオキサイド基、ポリプロピレンオキサイド基であり、またnは、好ましく
は1～20の整数である。またポリペプチド基は、特に限定されるものではないが、好ま
しくはアミノ酸1～20個からなるものである。またポリエステル基は、特に限定されるも
のではないが、好ましくはポリグリコール酸基、ポリ乳酸基である。

[0056] 本発明の架橋ヒアルロン酸微粒子の製造方法としては、微粒子の溶媒留去による
乾燥と架橋反応が同時に進行する製造方法であれば良い。例えば、液体を噴霧乾
燥するスプレードライヤーを用い、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導
体と薬物とを含む溶液を噴霧乾燥することで、濃縮乾燥中にヒアルロン酸誘導体を架
橋し、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を得ればよい。スプレ
ードライを用いる場合は、薬物の変性を防ぐために、乾燥温度は100°C以下であるこ
とが好ましい。

[0057] あるいは、架橋反応可能なHA誘導体(テトラブチルアンモニウム塩)と薬物をDMS
O等の極性有機溶媒に溶かしておき、二酸化炭素等の超臨界液体を添加、DMSO
を抽出することでヒアルロン酸濃縮中に架橋反応を起こさせ、微粒子を得ても良い。

これらの微粒子化方法を用いる時は、Tween-20、Tween-80等の界面活性剤を添加(1%～2%程度)することで、生成された微粒子の回収率を上げることができる。また、これらの製造方法を取る場合、濃縮前の架橋反応を起こさない調製液を用いる必要がある。架橋剤混合から濃縮までの時間、架橋性官能基の導入率、ヒアルロン酸分子量、濃度によって異なるが、架橋性官能基の導入率は、5モル%～70モル%、ヒアルロン酸分子量は、1万ダルトン～200万ダルトン、ヒアルロン酸濃度は、0.1%～5%が好ましい。

[0058] また、別法としては、架橋反応可能な官能基を有するヒアルロン酸誘導体と薬物とを含む水溶液を脱水性を有する液体(例えば、分子量400ダルトンのポリエチレンゴリコール等)の中にエマルジョン化することで、脱水濃縮中にヒアルロン酸を架橋し、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を得ることもできる。この方法を用いる時は、封入効率を上げるため、カチオン性かノニオン性の薬物が好ましい。

[0059] また、微粒子形成後に熱処理をすることでさらに含水率を低下させ、架橋反応を完全に終了させたほうが好ましい。この場合、架橋密度も上がり、徐放期間の延長も期待できる。ここで、熱処理の温度は特に限定はされないが、例えば30～110℃、好ましくは30～60℃で行うことができる。

[0060] 乾燥後の微粒子径は、用途によって最適化すればよいが、インジェクタブルにするために通常、0.01 μ m～150 μ mが好ましい。経鼻、経肺投与の時は、0.01 μ m～5 μ mが吸入効率の点で好ましく、静注投与の時には、0.01 μ m～0.2 μ m程度が血中動態の点から好ましい。

[0061] 本発明に用いられるHAは、どのようにして得られたHAでもよく、動物組織から抽出されたHA、発酵法で得られたHA、化学合成で得られたHAなど、その由来は限定されない。さらに、加水分解処理など、HAにさらなる処理を行ってもよい。本発明のHAには、様々な方法で修飾された修飾HAや、ナトリウム、カリウム、リチウムなどのアルカリ金属塩なども含有される。HAはカルボキシル基とハイドロキシル基が修飾されることが多いが、本発明において修飾HAはどの部分が修飾されていてもよい。修飾HAは特に限定されず、どのような修飾がされていてもよいが、例えば、硫酸化さ

れたHA(WO95/25751)、N-硫酸化されたHA(WO98/45335)、エステル化されたHA(EP0216453、WO98/08876、EP0341745)、過沃素酸酸化されたHA、アミド修飾されたHAなどを挙げることができる。

[0062] 本発明に用いられる原料HAの分子量は特に限定されず、いかなる分子量のHAでも使用することが可能であるが、通常5000ダルトン～350万ダルトン、好ましくは1万ダルトン～100万ダルトンのHAを用いることができる。また、HAの分子量と濃度は、製造後の粒子径に影響するため、目的とする粒子径に応じて選択すればよい。

[0063] 薬効を持つタンパク質、ペプチドとしては特に限定されないが、例えば、エリスロポエチン(EPO)、グラニュロサイトコロニー刺激因子(G-CSF)、インターフェロン- α 、 β 、 γ 、(INF- α 、 β 、 γ)、トロンボポエチン(TPO)、シリアリーニュートロフィックファクター(CNTF)、チューマーネクローシスファクター結合タンパク質(TNFbp)、インターロイキン-10(IL-10)、FMS類似チロシンカイネース(Flt-3)、成長ホルモン(GH)、インシュリン、インシュリン類似成長因子-1(IGF-1)、血小板由来成長因子(PDFG)、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)、ブレイン由来ニューロトロフィックファクター(BDNF)、ケラチノサイト成長因子(KGF)、幹細胞因子(SCF)、メガカリオサイト成長分化因子(MGDF)、オステオプロテゲリン(OPG)、レプチニン、副甲状腺ホルモン(PTH)、塩基性フィブロblast成長因子(b-FGF)、骨形成タンパク質(BMP)、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)、抗体、ダイアボディー等が挙げられる。また本発明の薬物徐放担体は、低分子量化合物の薬剤にも使用することができる。低分子薬剤としては、制癌剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド)、免疫抑制剤、抗炎症剤(例えば、ステロイド剤、非ステロイド剤抗炎症剤)、抗リウマチ剤、抗菌剤(例えば、 β -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、サルファ剤)などを挙げることができる。

[0064] 本発明の徐放担体は、1種もしくはそれ以上の薬学的に許容し得る希釈剤、湿润剤、乳化剤、分散剤、補助剤、防腐剤、緩衝剤、結合剤、安定剤等を含む薬学的組成物として、目的とする投与経路に応じ、適当な任意の形態にして投与することができる。

きる。投与経路は非経口的経路であっても経口的経路であってもよい。

図面の簡単な説明

[0065] [図1]架橋HA-SH マイクロハイドロゲル微粒子を顕微鏡で撮影した写真の一例である。

[図2]PBS中での膨潤後の架橋HA-SH マイクロハイドロゲル微粒子を顕微鏡で撮影した写真の一例である。

[図3]EPOを封入した架橋HA-SH マイクロヒドロゲルについて熱重量分析を行った結果の一例である。

[図4]実施例1-4において得られた架橋HA-SH マイクロハイドロゲル微粒子から回収されたEPOの量を示すRP-HPLC分析の結果の一例を示すグラフであり、下からそれぞれ実施例1、実施例2、実施例3、実施例4で得られて微粒子を示すものである。

[図5]実施例3と比較例1で得られたHAゲルからのEPOの放出性を示すグラフである。

[図6]実施例9-1で得られたヒアルロン酸誘導体(HA-HZ)の¹H-NMRの測定結果の一例である。

[図7]実施例9-2で得られたヒアルロン酸誘導体(HA-HZ-SH)の¹H-NMRの測定結果の一例である。

[図8]実施例10で得られたヒアルロン酸誘導体(HA-HZ-MA)の¹H-NMRの測定結果の一例である。

[図9]実施例11-1で得られたヒアルロン酸誘導体(HA-AM)の¹H-NMRの測定結果の一例である。

[図10]実施例11-2で得られたヒアルロン酸誘導体(HA-AM-SH)の¹H-NMRの測定結果の一例である。

[図11]実施例11-1で得られたヒアルロン酸誘導体(HA-AM-MA)の¹H-NMRの測定結果の一例である。

[図12]実施例12により得られた粒子のキュアリングによる水分量の変化を示すグラフである。

[図13]実施例12により得られた粒子のキュアリングによる膨潤抑制効果を示すものである。

実施例

[0066] EPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子の調製

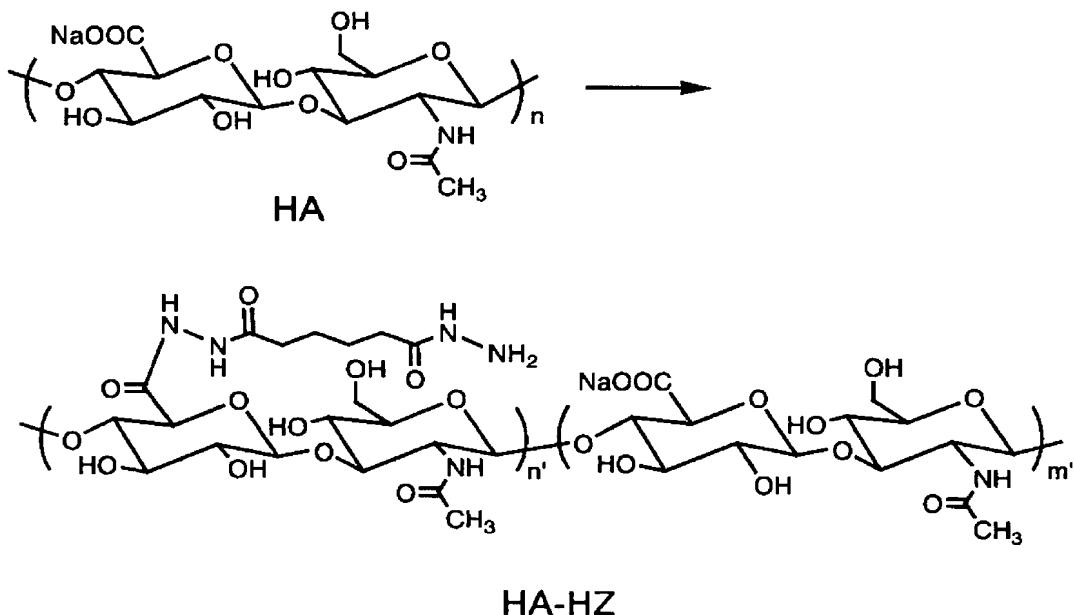
以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0067] NMR測定は、核磁気共鳴装置 JNM-ECA500(日本電子株式会社製)を用いて重水(D_2O)を溶媒に用いて測定した。また置換基の導入率の決定は、導入した置換基特有のピークとヒアルロン酸由来のピークの積分比より決定した。

[実施例1]

[実施例1-1] ヒドラジド基(HZ基)が導入されたヒアルロン酸誘導体(HA-HZ)の合成

[0068] [化4]



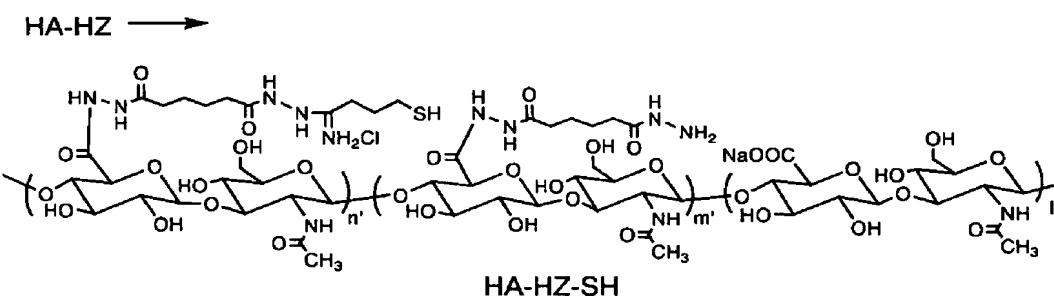
[0069] 分子量 1.9×10^5 ダルトンのヒアルロン酸(HA)(電気化学工業株式会社製)200mgを0.5%濃度で蒸留水に溶解し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に調製した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)とアジピン酸ジヒドラジド(

ADH)を、HA:EDC:ADH=1:0. 3:40(バッチ1-1)、1:1:40(バッチ1-2)、1:5:40(バッチ1-3)モル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4. 7~4. 8に保ちながら室温で攪拌下2時間反応させた。100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール溶液で透析(スペクトラポア7、分画分子量(MWCO):12k~14kダルトン)し、凍結乾燥して標題のHA-HZを得た。

[0070] 得られたHA-HZ中のHZ基導入率をプロトンNMR法で定量したところ、それぞれ、HAのカルボン酸の26%(バッチ1-1)、46%(バッチ1-2)、69%(バッチ1-3)がHZ化されていた(HAおよびHA-HZのN-アセチル基(1. 9ppm、3H)、HA-HZのアジピン酸由来部分のメチレン基(1. 6ppm、2. 3ppm、各2H)を比較)。

[実施例1-2] メルカプト基(SH)が導入されたヒアルロン酸誘導体(HA-SH)の合成

[0071] [化5]



[0072] 実施例1-1のバッチ1~3のHA-HZ、各々100mgを5mLの100mMリン酸バッファーpH8に溶かし(HA-HZ:2%w/v)、イミノチオラン(ITL)を添加し(HZ/ITL=1/2モル比)、室温で攪拌下 2~4時間反応させた。エタノールで沈殿、3回洗浄し、乾燥させた。また、得られたHA-SH中のSH基導入率をプロトンNMR法で定量した結果を表1に示す。(HAおよびHA-SHのN-アセチル基(1. 9ppm、3H)、HA-SHのITL由来部分のメチレン基(2. 1ppmと2. 7ppm、各2H)を比較)。

[0073] [表1]

表 1

	対照	バッチ 1	バッチ 2	バッチ 3
HZ 基の導入率	0%	26%	46%	69%
SH 基の導入率	0%	20%	35%	56%

[0074] [実施例1-3] EPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子の調製

実施例1-2のバッチ1の、SH基の導入率が20モル%であるHA-SH200mgと、エリスロポエチン(EPO)2mgを20mLの10mMリン酸バッファーpH8(PB)に溶かした(室温、1時間攪拌)。これに、4mgのTween-20、SH基に対して1モル倍のテトラチオン酸ナトリウム(Sodium tetrathionate:STT)22.3mgを加えた。この溶液を以下の条件でスプレードライし、微粒子を得た。

スプレードライヤー:ビュッヒ社製、ミニスプレードライヤー B-191

Solution feed rate : 1.5 mL/min (Tygon tube, Pump speed = 15%)

Feed solution concentration : 10 mg/mL

Atomizing air flow rate : 650 L/hr

Drying air flow rate : 40 kL/hr (Aspiration speed = 65%)

Inlet temperature : 85 ～ 95°C

Outlet temperature : 50 ～ 60°C

[実施例2]

実施例1-3の実験操作において、バッチ2のSH基の導入率が35モル%であるHA-SHを200mgと、テトラチオン酸ナトリウム(Sodium tetrathionate:STT)39.0mg(SH基に対して1モル倍)を使用したこと以外は実施例1-3と同様の方法でEPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

[実施例3]

実施例1-3の実験操作において、バッチ3のSH基の導入率が56モル%であるHA-SHを200mgと、テトラチオン酸ナトリウム(Sodium tetrathionate:STT)62.4mg(SH基に対して1モル倍)を使用したこと以外は実施例1-3と同様の方法でEPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

[実施例4]

実施例1-3の実験操作において、バッヂ3のSH基の導入率が56モル%であるHA-SHを200mgと、SH基に対して0.7モル倍のテトラチオン酸ナトリウム(Sodium tetrathionate:STT)38.9mgを使用したこと以外は実施例1-3と同様の方法でEPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

[実施例5]

実施例1-3の実験操作において、バッヂ3のSH基の導入率が56モル%であるHA-SHを200mgと、SH基に対して0.5モル倍のテトラチオン酸ナトリウム(Sodium tetrathionate:STT)27.8mgを使用したこと以外は実施例1-3と同様の方法でEPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

[実施例6]

実施例3の実験操作において、4mgのTween-20の代わりに、Tween-80を4mg使用したこと以外は実施例3と同様の方法でEPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

[実施例7]

実施例3の実験操作において、Tween-20を加えずに行ったこと以外は実施例3と同様の方法でEPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

[実施例8]

実施例3の実験操作において、STTを加えずに行ったこと以外は実施例3と同様の方法でEPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子を調製した。

[比較例1]

実施例1-2で調製したバッヂ3のSH基の導入率が56モル%であるHA-SH 33mgを690 μ Lの10mMリン酸バッファー(pH8.0)に溶かし、30 μ LのEPO水溶液(10mg/mL)を添加し、10分攪拌した。これに、SH基に対して1モル倍のSodium tetrathionate(STT)9.3mgを30 μ Lの10mMリン酸バッファーpH8.0に溶かした溶液を加え、250 μ Lを1mLシリンジに詰めて37°Cで5時間反応させることで、円柱状のHAゲルを得た。

[比較例2]

実施例8で、HA-SHではなくHAを使用したこと以外は実施例8と同様の方法でEPO封入HA微粒子を調製した。

[0075] なお、実施例1～8および比較例2における各微粒子の回収率は50%～65%であった。

[試験例1] 粒子径、粒子含水率測定

実施例3において調製した微粒子の顕微鏡写真を図1に示す(3000倍)。この微粒子をPBS中に分散させた時の顕微鏡写真を図2に示す(3000倍)。当該微粒子の乾燥時の粒子径は約1.2 μmであり、水膨潤時の粒子径は約1.8 μmであった。

[0076] 熱重量分析(TGA)を行い、実施例3で製造した微粒子の含水率を測定した(図3)含水率は約15%であった。

[試験例2] EPO封入架橋ヒアルロン酸微粒子のEPO回収率測定

実施例1～8、比較例2の微粒子5mgを0.5mLのPBSに分散させ、Hyaluronidase SD(生化学工業製:HAse)0.25ユニットを添加、25℃で3時間、酵素処理を行い、微粒子を完全に分解させた。また、比較例1のゲル(0.25mLゲル)にHyaluronidase SD(生化学工業製)0.5ユニットを含むPBSpH7.4を0.75mL加え、25℃で1日、酵素処理を行い、ゲルを完全に分解させた。酵素処理後の溶液0.15mLを、試料溶液とした。試料溶液は、逆相クロマトグラフィー(RP-HPLC)測定を行い、0.1mg/mLのEPO水溶液を標準溶液として、標準溶液と試料溶液のピークエリア比から試料溶液中EPO濃度を算出した。添加したEPO量(0.1mg/ゲル1個)に対してRP-HPLCより求めたEPO量を回収率として算出した。

[0077] 逆相カラムによる高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)分析は、Waters600Sコントローラ、717plusオートサンプラー、486赤外光吸収測定器(Waters社製)を用い、以下の測定条件より行った。

カラム:C4(粒子径 5 μm、サイズ 4.6 × 250mm)

移動相:

A:水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸=400/100/1

B:水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸=100/400/1

流速:1mL/分、移動相A/B=65/35～0/100のグラジエント溶出

カラム温度:室温付近

サンプル温度:4°C

検出波長:UV 280nm

解析ソフト:Millenium32ver. 3. 21

上記方法で測定されたEPOを仕込みに対する回収率は、以下のとおりであった。

実施例1～4:90%～95%

実施例5および6:80%～85%

実施例7および8:75%～80%

比較例1および2:90%～95%

以上の結果より、STT、界面活性剤を添加することで回収率が改善されることが確認された。

[試験例3] EPO封入HAヒドロゲル調製からのEPO徐放

実施例3のマイクロハイドロゲル20mgと比較例1のバルクゲル(250 μL)を2mLのPBS中、37°Cでインキュベートし、経時的に200 μLサンプリングした。RP-HPLCでバッファー中に放出されたEPOを定量した。

[0078] ゲル調製直後にヒアルロニダーゼで分解、回収されたEPOを100%とした時のゲルからのEPO放出性を図1に示す。尚、9日後にヒアルロニダーゼ(HAse)を添加した。

[0079] ゲル内のEPOは変性せず、比較例1のゲルは、架橋密度が低い為EPOの放出が早く、実施例3のマイクロゲルは架橋密度が高い為、30%程度が5日程度で徐放され、40%のEPOが拡散では放出されずに酵素分解によって初めて放出されることが分かる。

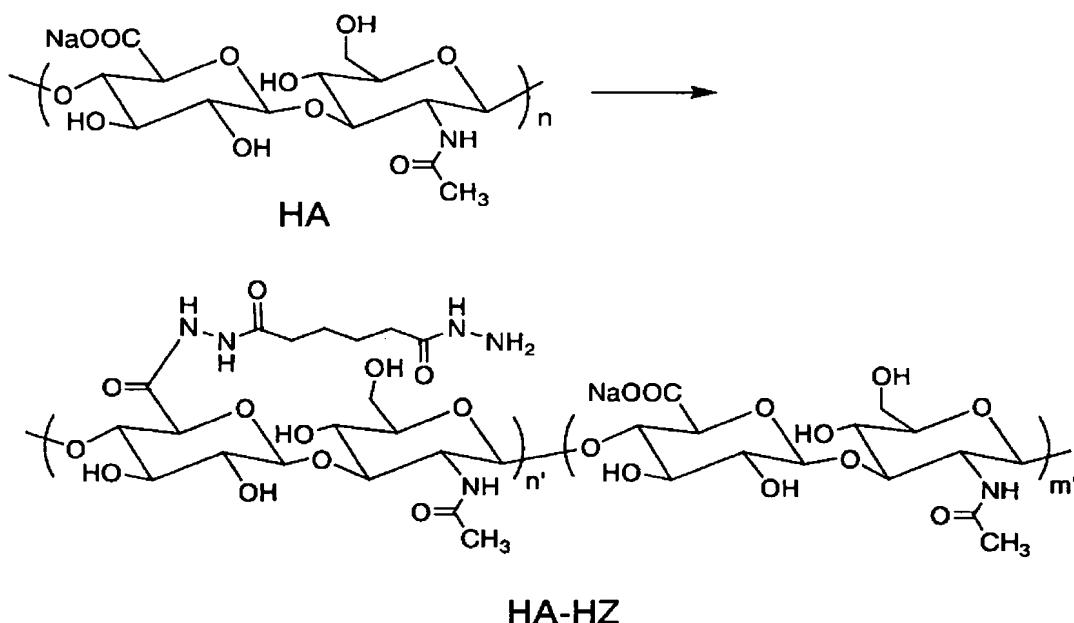
[0080] 上記実施例に例示された、薬物をヒアルロン酸架橋体中に封入した薬物担持微粒子を用いることで、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらをin situ架橋、乾燥し、ゲル微粒子の中に封入したタンパク質またはペプチド等を長期間放出するインジェクタブルな薬物徐放製剤を調製することが可能である。

[実施例9]

[実施例9-1] ヒドラジド基(HZ)が導入されたヒアルロン酸誘導体HA-HZの合成(

混合溶媒法)

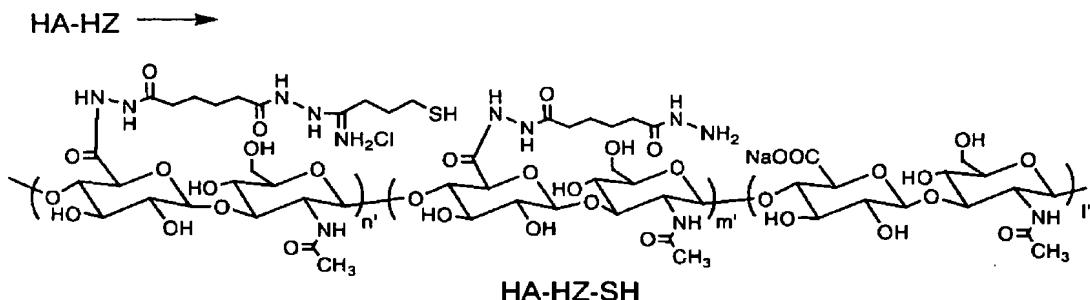
[0081] [化6]



[0082] 分子量 2×10^5 ダルトンのHA(電気化学工業株式会社製)76.0mgを、0.1%濃度で蒸留水/EtOH=50/50に溶解し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に調整した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)とアジピン酸ジヒドラジド(ADH)を、HAのユニット(1ユニット=繰り返し単位であるN-アセチルグルコサミングルクロン酸):EDC:ADH=1:4:40モル比になるよう添加し、5N塩酸でpHを4.7~4.8に保ちながら室温で2時間反応させた。大過剰量の100mM塩化ナトリウム溶液、25%エタノール溶液、蒸留水に対して順に透析(スペクトラポア7、分子量(MWCO):12k-14kダルトン)し、凍結乾燥して標題のヒドラジド基(HZ基)が導入されたヒアルロン酸(HA-HZ)57.0mgを得た。得られたHA-HZ中のHZ基導入率をADH導入率としてプロトンNMR法で定量した(HA:N-アセチル基(1.85ppm)、HZ:ADH由来の4つのメチレン(1.5、2.1および2.25ppm)を比較)。HZ導入率は47%であった。

[実施例9-2] メルカプト基(SH)が導入されたヒアルロン酸誘導体HA-HZ-SHの合成

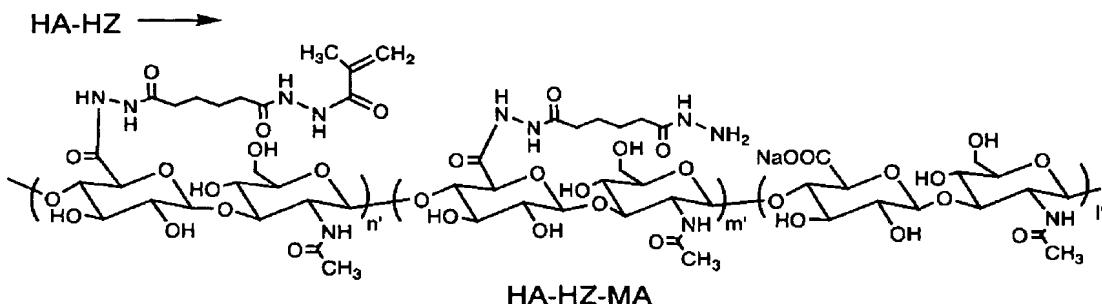
[0083] [化7]



[0084] 実施例9-1と同様の方法で合成したHA-HZ、100mgを5mLの100mMリン酸バッファー(pH8)に溶かし(HA-HZ:2%w/v)、イミノチオラン(ITL)を添加し(HZ/ITL=1/2モル比)、室温で攪拌下2時間反応させた。エタノールで沈殿、3回洗浄し、乾燥させた。得られたHA-HZ-SH中のSH基導入率をプロトンNMR法で定量した結果、SH導入率は37.5モル%であった。(HAおよびHA-HZ-SHのN-アセチル基(1.9ppm、3H)、HA-HZ-SHのITL由来部分のメチレン基(2.1ppmと2.7ppm、各2H)を比較)。

[実施例10] メタクリロイル基(MA)が導入されたヒアルロン酸誘導体HA-HZ-MAの合成

[0085] [化8]



[0086] HAの分子量を 2×10^4 ダルトンとしたこと以外は、実施例1-1のバッチ3と同様の方法で合成されたHA-HZ(HAのカルボン酸が63%HZ化)を蒸留水に溶解した後に、1Mリン酸緩衝液(pH8.8)を添加し、HA濃度50mg/mLの0.1Mリン酸緩衝液を調製した。メタクリル酸無水物をHZの20倍当量を滴下して添加し、室温で攪拌下一晩反応させた。テトラヒドロフランで沈殿後、回収し乾燥させた。沈殿物を蒸留水に

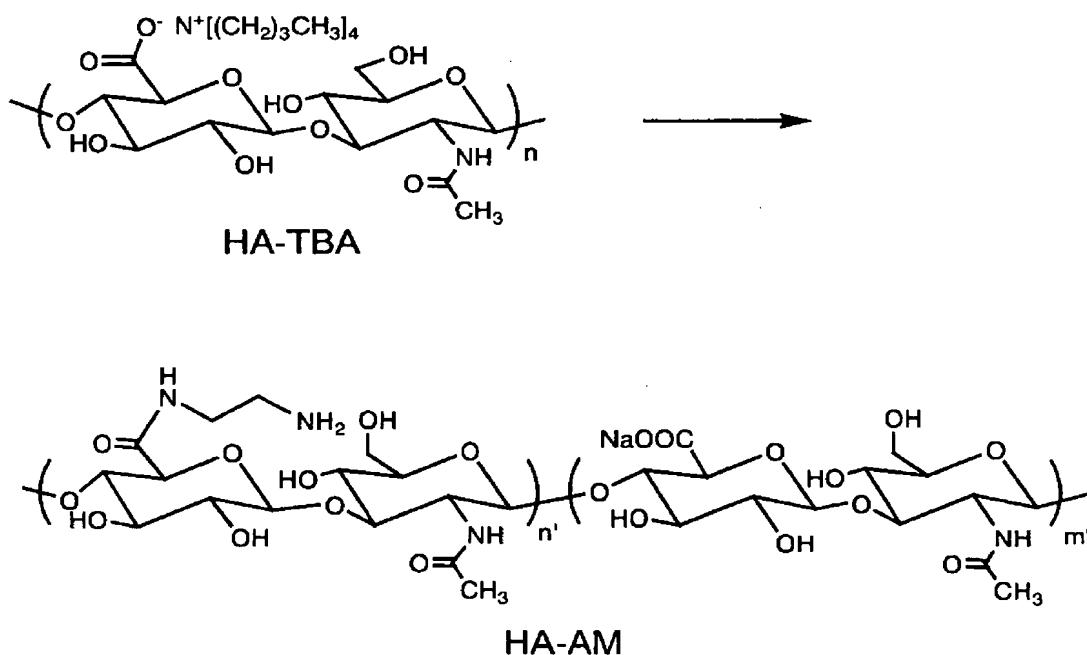
溶解し、再びテトラヒドロフランで沈殿、乾燥させた後、乾燥物を蒸留水に溶解し、凍結乾燥して標題のHA-HZ-MAを得た。

[0087] メタクリロイル基の導入率はプロトンNMRにより算出した(HA:N-アセチル基のメチルプロトン(1.8~1.9ppm)、MA:メタクリロイル基のCH₂=(5.5~6.1ppm)を比較)。MA導入率は22%であった。

[実施例11]

[実施例11-1] アミノ基(AM)が導入されたヒアルロン酸誘導体HA-AMの合成

[0088] [化9]



[0089] 分子量 2.0×10^5 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウム(HA)(電気化学工業株式会社製)をテトラブチルアンモニウムハイドロオキサイド(シグマーアルドリッヂ社)によりテトラブチルアンモニウム(TBA)塩化したDOWEX 50WX8-400(シグマーアルドリッヂ社)を用いてTBA塩化を行った。

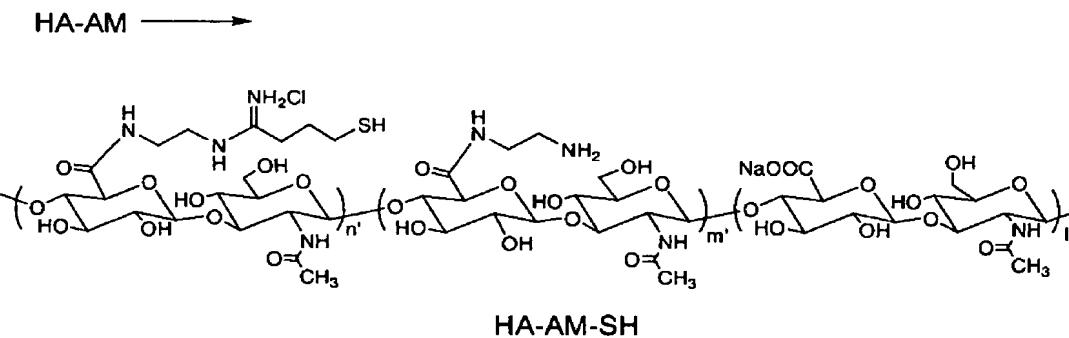
[0090] ヒアルロン酸テトラブチルアンモニウム塩(HA-TBA)を2.0mg/mL濃度となるようDMSO(和光純薬株式会社)に溶解後、HAユニット/BOP(和光純薬株式会社)/エチレンジアミン(EDA)(シグマーアルドリッヂ社)=1/2.5/50(mol/mol/mol)の当量比でEDA、BOPの順で添加し、室温下で一晩反応させた。その後1M

塩化ナトリウム水溶液を反応溶液の1/2量加えた後、5N HClを加えてpHを3まで低下させ、さらに2N NaOHにて中和を行った。大過剰量の0.3M 塩化ナトリウム水溶液、蒸留水の順に透析精製し(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kダルトン)、限外ろ過後、凍結乾燥して標題のアミノ基が導入されたヒアルロン酸(HA-AM)を得た。

[0091] アミノ基の導入率はプロトンNMRにより算出した(HA:N-アセチル基のメチルプロトン(1.8-1.9 ppm)、AM:エチレンジアミン部分のメチレンプロトン(2.9-3.1 ppm)を比較)。導入率はそれぞれ88.5%であった。

[実施例11-2] メルカプト基(SH)が導入されたヒアルロン酸誘導体HA-AM-SHの合成

[0092] [化10]

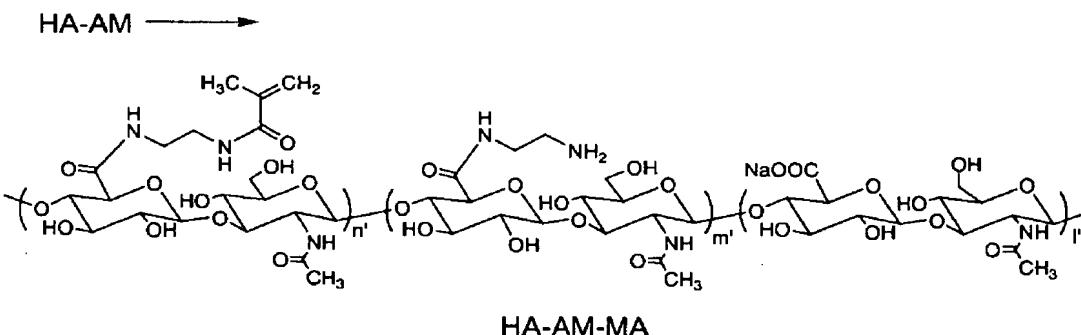


[0093] 上記で得られたHA-AMを炭酸緩衝溶液(pH9)に2mg ? mLで溶解させた後、イミノチオラン(ピアス社)をHAユニットに対して0.5、もしくは1倍等量加え、45分間室温で反応させた。反応後、0.005N HCl水溶液で平衡化したPD-10カラム(アムシャム・バイオサイエンス株式会社)にて精製を行った。その後凍結乾燥により溶媒を除いた後、得られたポリマーを過剰のエタノールで洗浄し減圧乾燥を行いHA-AM-SHを得た。

[0094] メルカプト基の導入率は還元剤であるトリス(2-カルボキシエチルホスフィン)塩酸塩(TCEP)を含んだ状態でのプロトンNMRにより算出した(HA:N-アセチル基のメチルプロトン(1.8~1.9ppm)、SH:メルカプト基の隣のメチレンプロトン(2.4~2.7ppm)を比較)。導入率はそれぞれ16.5%、23.5%であった。

[実施例11-3] メタクリロイル基(MA)が導入されたヒアルロン酸誘導体HA-AM-MAの合成

[0095] [化11]



[0096] 上記で得られたHA-AMをリン酸緩衝溶液(pH7)に10mg/mLで溶解させた後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)で活性化したメタクリル酸をHAユニットに対し0.5、1.0、2.0倍当量添加し2時間室温で反応させた。反応後、0.3M 塩化ナトリウム水溶液、蒸留水の順に透析を行い(スペクトラポア4、分画分子量(MWCO):12k-14kダルトン)、精製を行った。その後、凍結乾燥を行い上記のポリマーを得た。

[0097] メタクリロイル基の導入率はプロトンNMRにより算出した(HA:N-アセチル基のメチルプロトン(1.8-1.9ppm)、MA:メタクリロイル基のCH₂=(5.5-6.1ppm)を比較)。導入率はそれぞれ14.8%、31.9%、68.9%であった。

[実施例12] 微粒子の熱処理効果(Swell抑制)

実施例9-2で合成したSH基の導入率が37.5モル%であるHA-HZ-SH100mgを8.5mLの蒸留水に溶解した。これに、100mMリン酸バッファー-pH7(PB)1mLを添加し、さらに5mgのTween-80を溶解し、SH基に対して1/10モル倍のSTT2.3mgを加えた。この溶液を実施例1-3と同様の条件(Solution feed rate 0.5mL/min Aspiration speed = 100%)でスプレードライし、微粒子を得た。この微粒子を50°C恒温槽(ヤマト科学製 DN-42)でキュアリングし24時間後、72時間後にサンプリングした。

[試験例4]

実施例12においてサンプリングした各試料の粒子の水分量をTGAにより計測した。この結果を図12に示す。また、顕微鏡を用いた画像解析により、各試料の30個の粒子をランダムに選択し、そのフェレー径を計測した(乾燥時の粒子径)。さらに、サンプリングした粒子にTween-80(0.05%)を含むPBS溶液を添加して膨潤させ、湿潤時の粒子の粒子径を同様に計測した。この結果を図13に示す。その結果、24時間のインキュベーションにより膨潤率が抑制されることが確認された。これは、50°C、24時間のインキュベーションで粒子内の架橋が増加したことによると考えられる。

[実施例13] HA-HZ-MA架橋マイクロゲルの調製

実施例10で合成したHA-HZ-MA100mgを6mLの蒸留水に溶解し、これにDTTを11mg、TEAを32.5μL溶解させた100mMリン酸バッファー-pH8.5(PB)を1mL加え、さらに蒸留水3mLを加えて混合した。この溶液を実施例12と同様の条件(排気温度65°C)でスプレードライし、微粒子を得た。この微粒子を50°C恒温槽(ヤマト化学 DN-42)で約72時間キュアリングし、粒子を得た。

[試験例5]

実施例13により得られた粒子をプレパラート上に置き、これにpH7のPBS溶液を添加してその粒子状態を顕微鏡で観察したところ、粒子はPBS溶液には溶解しなかつた。この観察結果より、実施例13において得られた微粒子における、メルカプト基と不飽和結合との間の付加反応による架橋の形成が確認された。

産業上の利用可能性

[0098] 本発明の薬物徐放担体は、タンパク質またはペプチド等の薬物の生物活性を維持したままこれらをin situ化学架橋、乾燥、HAゲル中に封入でき、優れた回収率でタンパク質、ペプチド等の薬物の長期徐放を可能にするインジェクタブルな微粒子を提供する。

請求の範囲

[1] 架橋多糖微粒子の製造方法であって、
a) 架橋可能な官能基を有する多糖誘導体を含む希薄溶液を調製する工程；
b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程；および
c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該多糖誘導体の架橋反応を進行させる工程
を含む前記製造方法。

[2] 多糖がヒアルロン酸である請求項1に記載の製造方法。

[3] 前記工程b)が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、請求項1または2に記載の製造方法。

[4] 得られる微粒子の平均粒子径が $0.01 \mu m$ ～ $150 \mu m$ である、請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。

[5] 得られる微粒子が薬物担体である、請求項1～4のいずれか1項に記載の製造方法。

[6] 得られる微粒子が薬物徐放担体である、請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法。

[7] 架橋反応前の希薄溶液が薬物を含み、当該薬物が架橋反応後に得られる微粒子中に担持されている、請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。

[8] 前記架橋反応が、薬物共存下でも薬物を変性させない架橋方法である請求項7に記載の製造方法。

[9] 前記架橋可能な官能基がメルカプト基であり、前記架橋反応がジスルフィド結合形成により架橋を形成する反応である、請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法。

[10] 前記架橋反応がメルカプト基と不飽和結合との間の付加反応により架橋を形成する反応である、請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法。

[11] 前記架橋反応がヒドラジド基と活性カルボン酸エステルとの間の反応により架橋を形成する反応である、請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法。

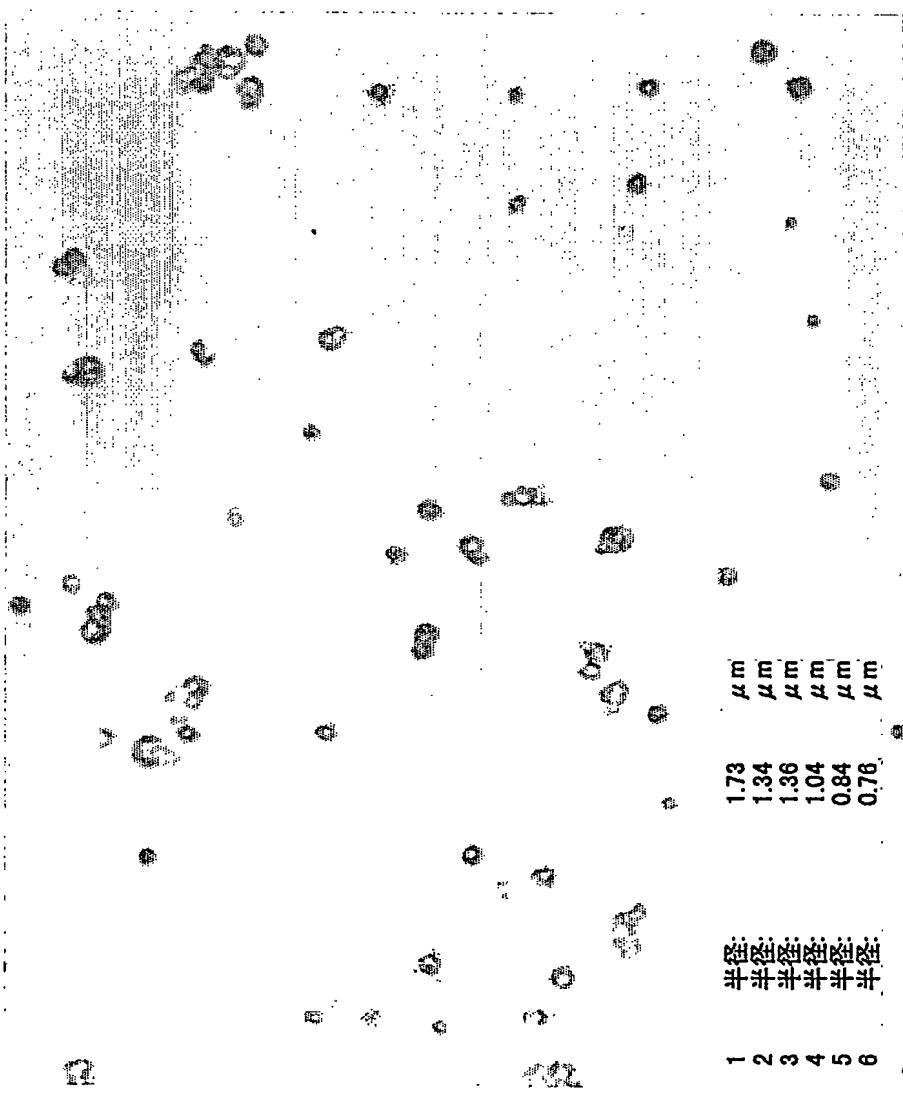
[12] 架橋多糖微粒子であって、

- a) 架橋可能な官能基を有する多糖誘導体を含む希薄溶液を調製する工程;
- b) 当該溶液を微粒子状の液滴に分散する工程; および
- c) 当該液滴に含まれる溶液の濃縮により当該多糖誘導体の架橋反応を進行させる工程

を含む製造方法により調製することができる前記架橋多糖微粒子。

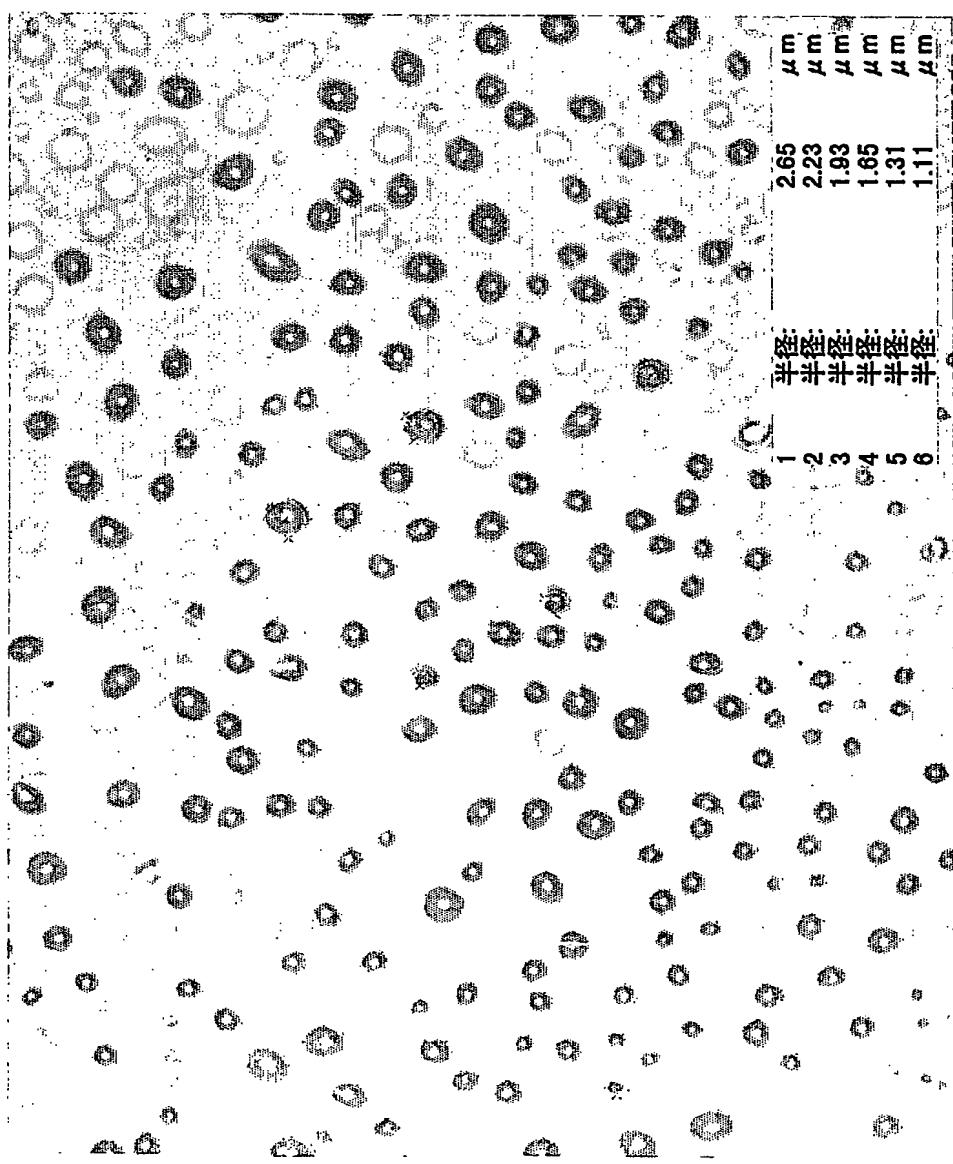
- [13] 多糖がヒアルロン酸である請求項12に記載の架橋多糖微粒子。
- [14] 前記工程b)が、前記溶液を噴霧することにより微粒子状の液滴に分散する工程である、請求項12または13に記載の微粒子。
- [15] 平均粒子径が、 $0.01 \mu m$ ～ $150 \mu m$ である請求項12～14のいずれか1項に記載の微粒子。
- [16] 薬物担体である請求項12～15のいずれか1項に記載の微粒子。
- [17] 薬物徐放担体である請求項12～16のいずれか1項に記載の微粒子。
- [18] 架橋反応前の希薄溶液が薬物を含み、当該薬物が架橋反応後に得られる微粒子中に担持されている、請求項12～17のいずれか1項に記載の微粒子。
- [19] 前記架橋反応が、薬物共存下でも薬物を変性させない架橋方法である請求項18に記載の微粒子。
- [20] 前記架橋可能な官能基がメルカプト基であり、前記架橋反応がジスルフィド結合形成により架橋を形成する反応である、請求項12～19のいずれか1項に記載の微粒子。
- [21] 前記架橋反応がメルカプト基と不飽和結合との間の付加反応により架橋を形成する反応である、請求項12～19のいずれか1項に記載の微粒子。
- [22] 前記架橋反応がヒドラジド基と活性カルボン酸エステルとの間の反応により架橋を形成する反応である、請求項12～19のいずれか1項に記載の微粒子。

[図1]



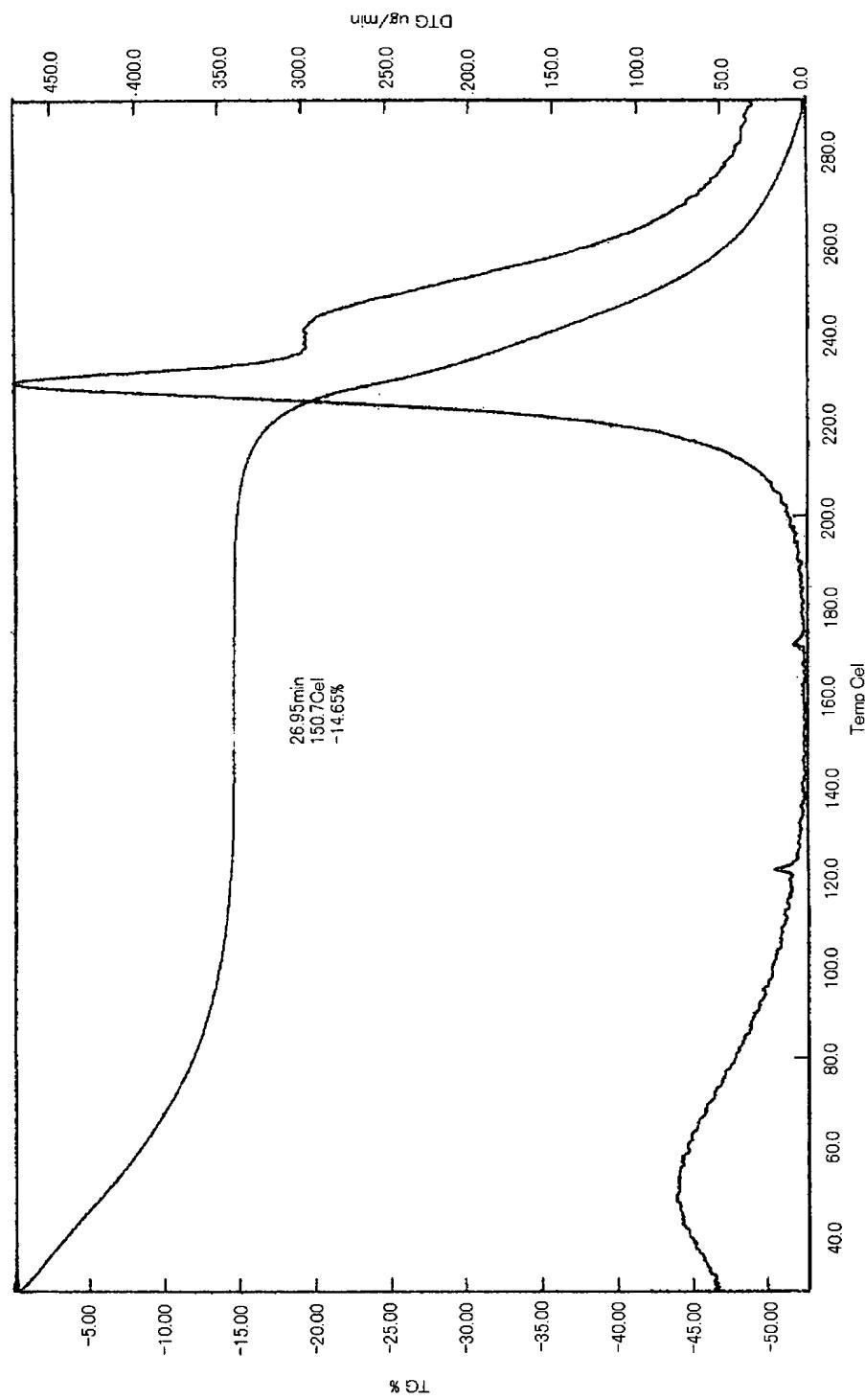
差替え用紙(規則26)

[図2]

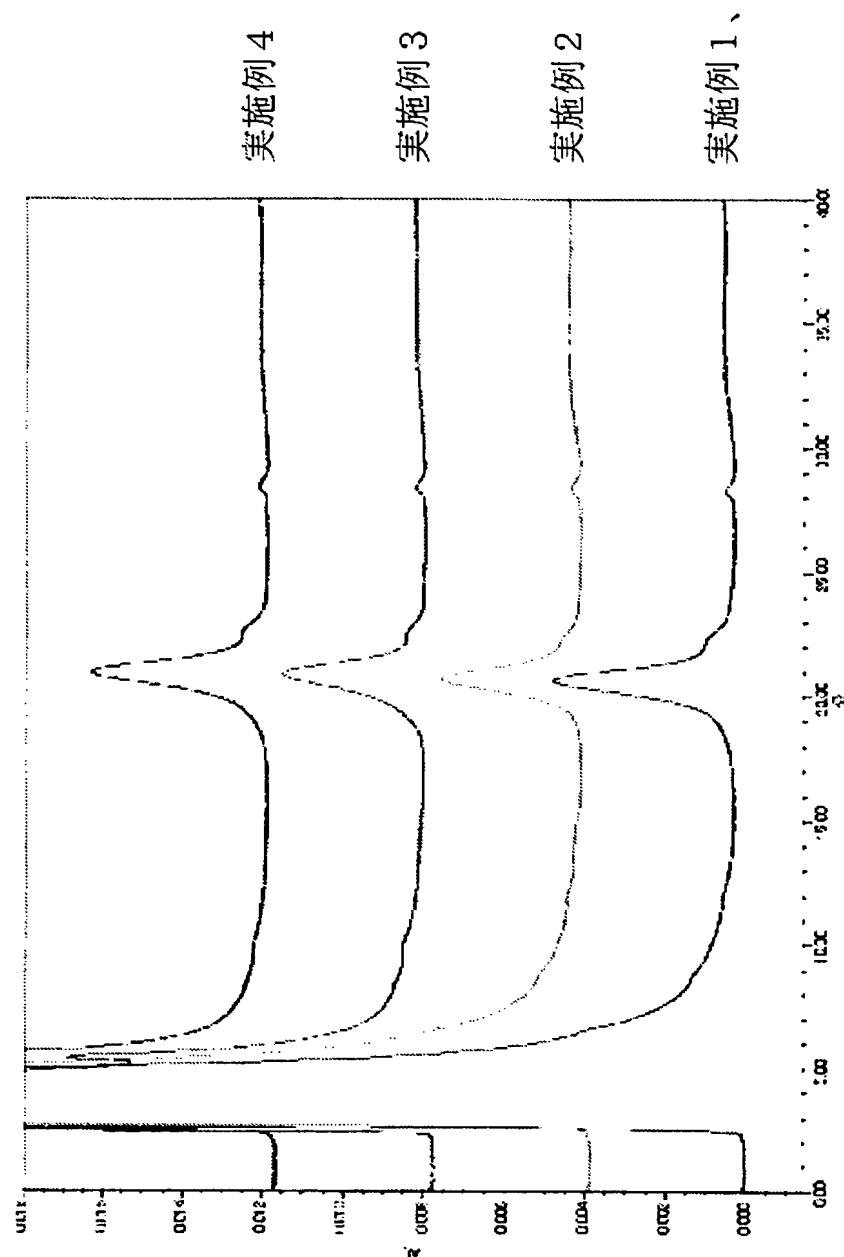


差替え用紙(規則26)

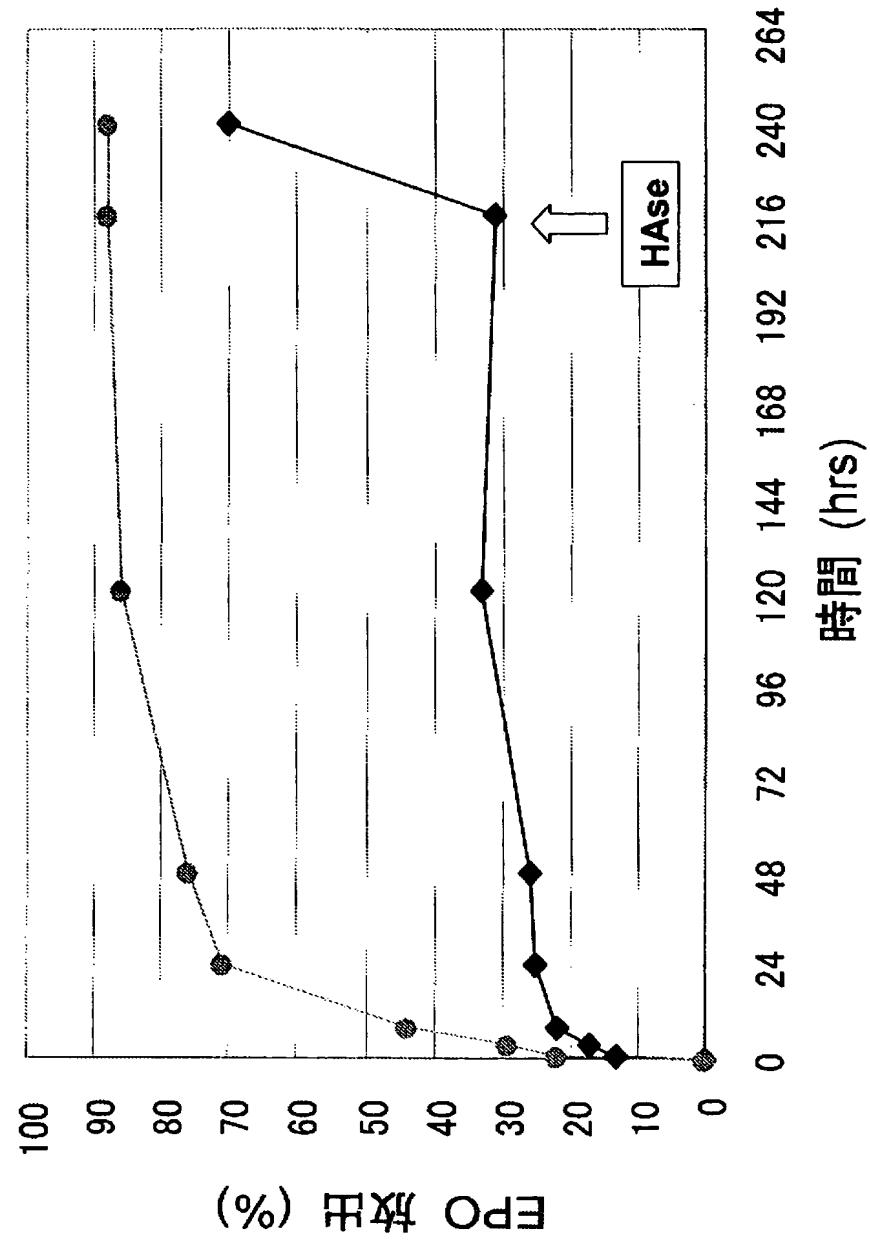
[図3]

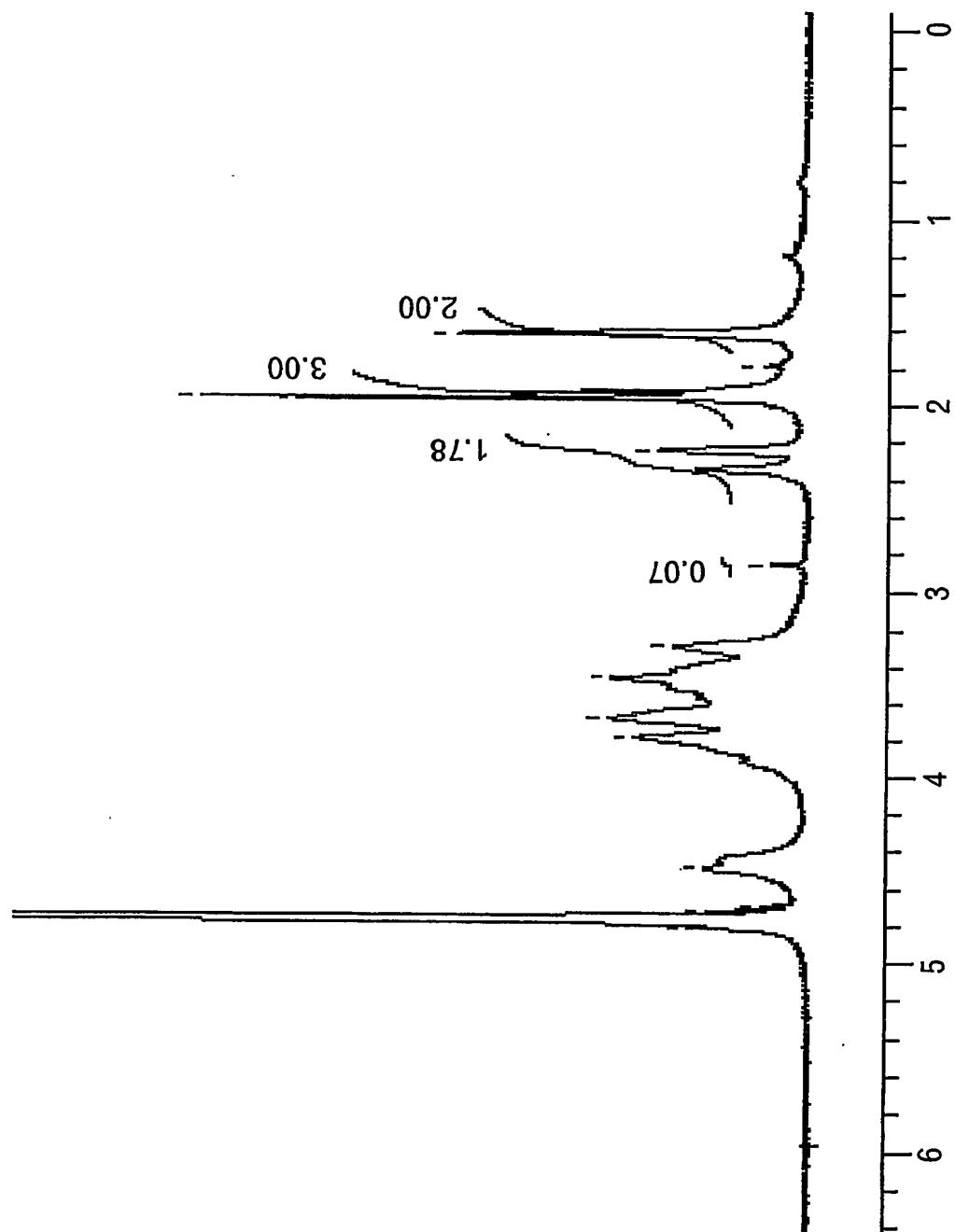


[図4]



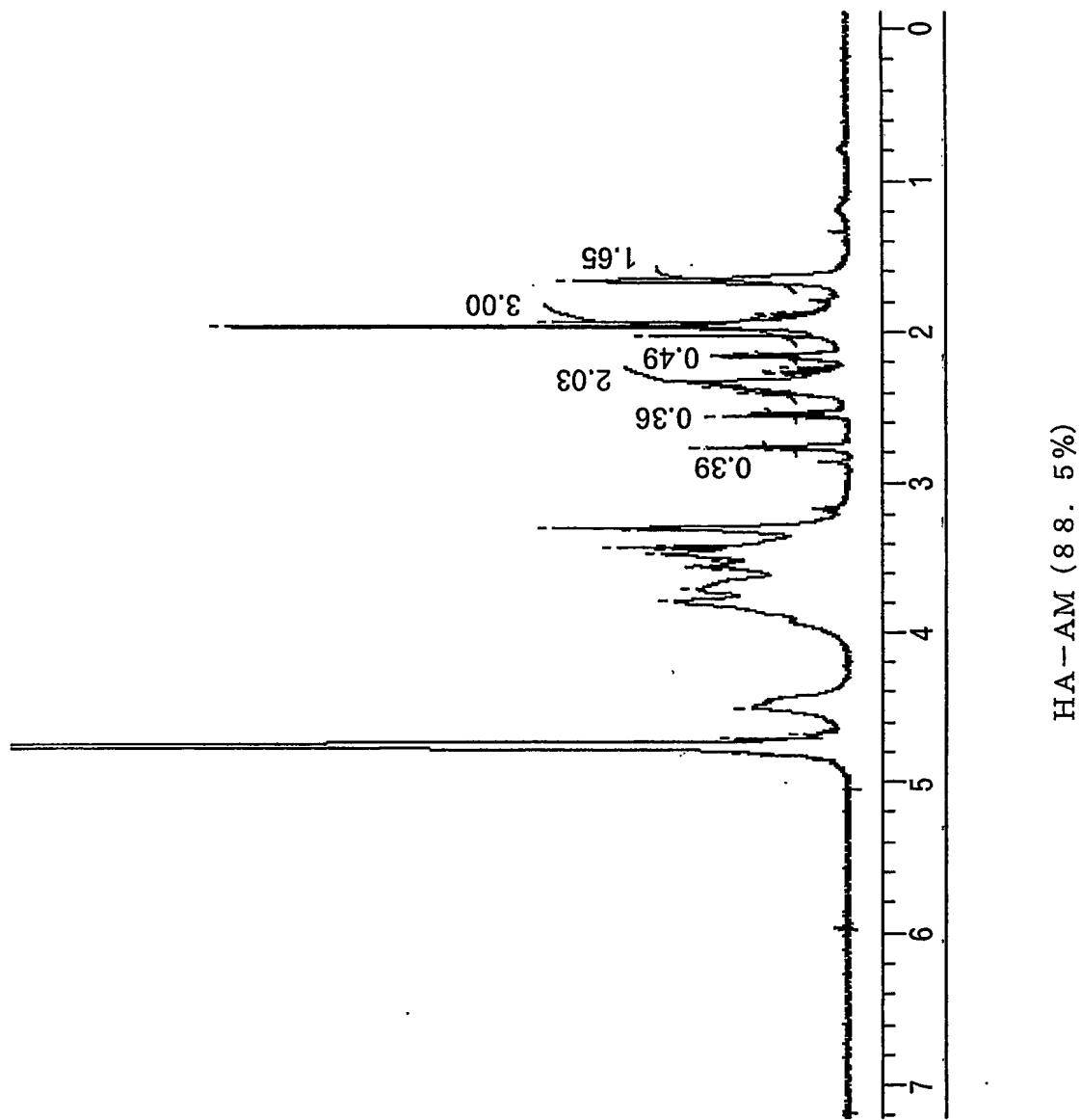
[図5]





[図6]

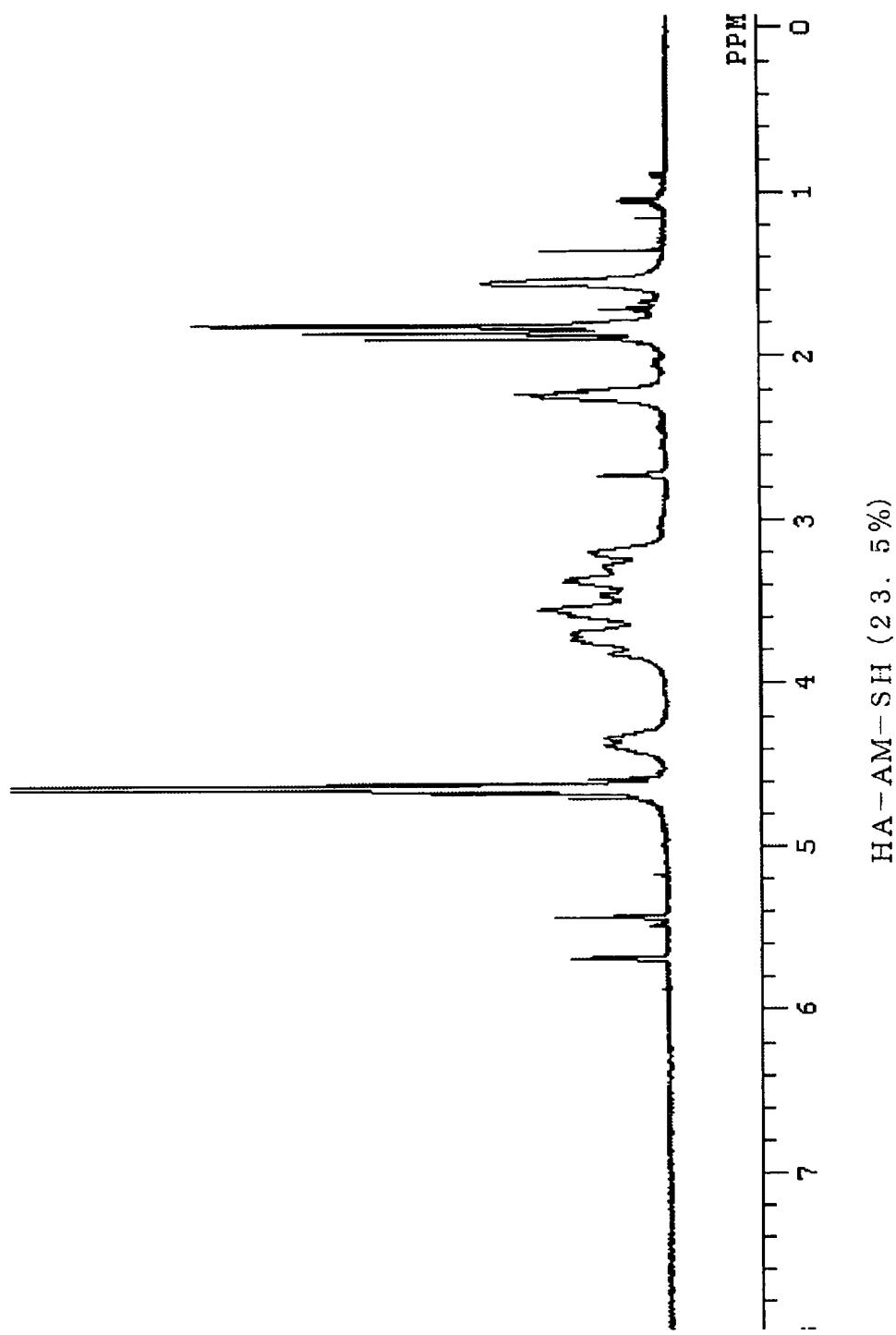
差替え用紙(規則26)



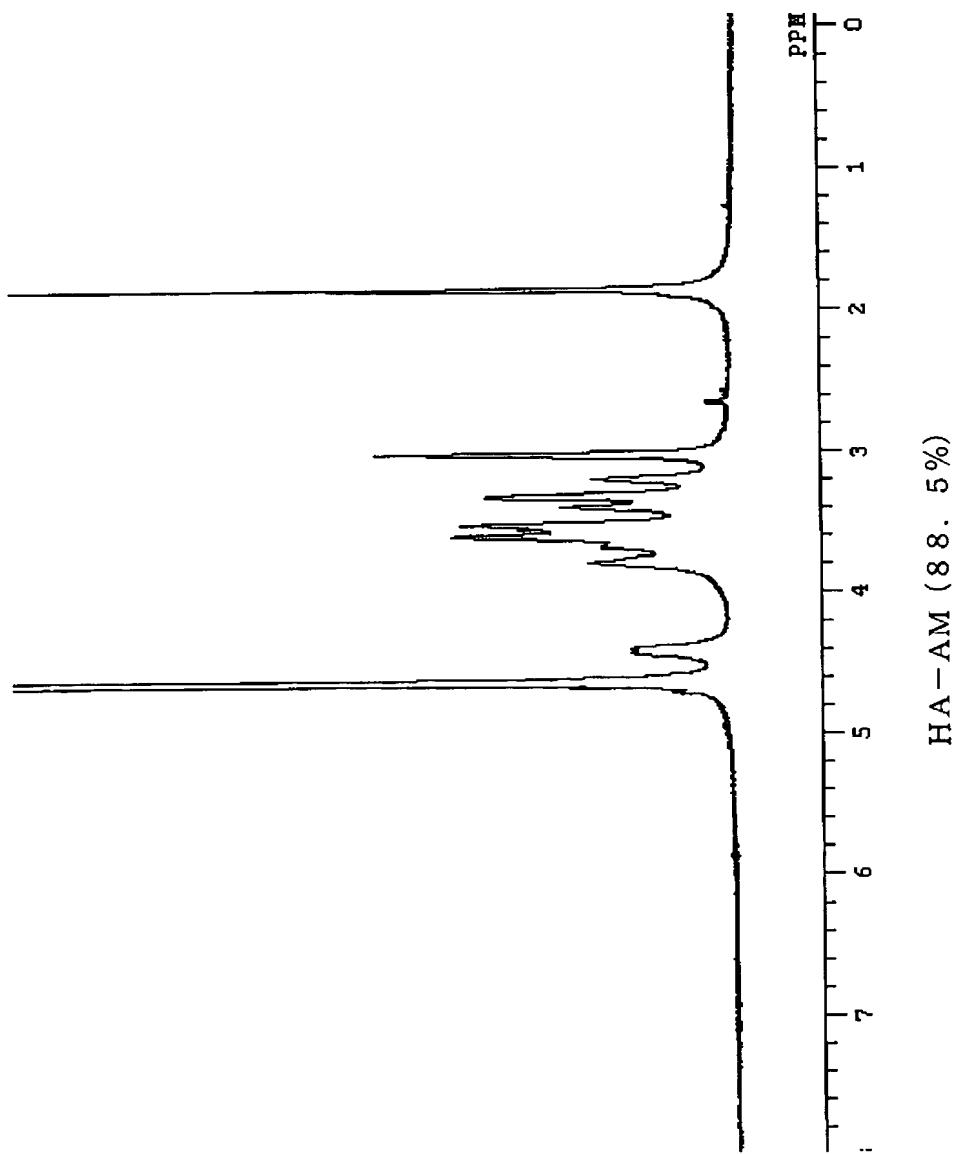
[図7]

差替え用紙(規則26)

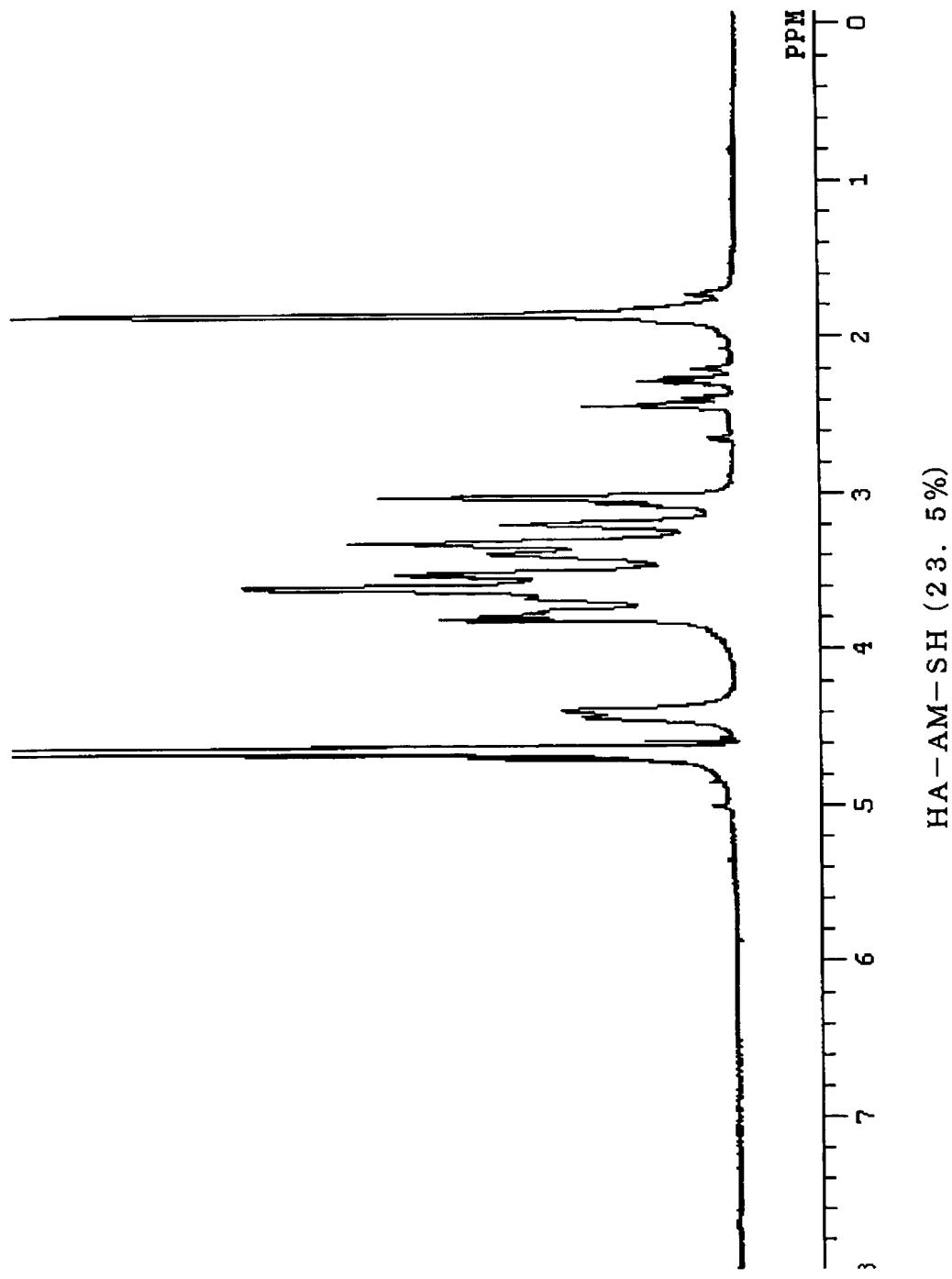
[図8]



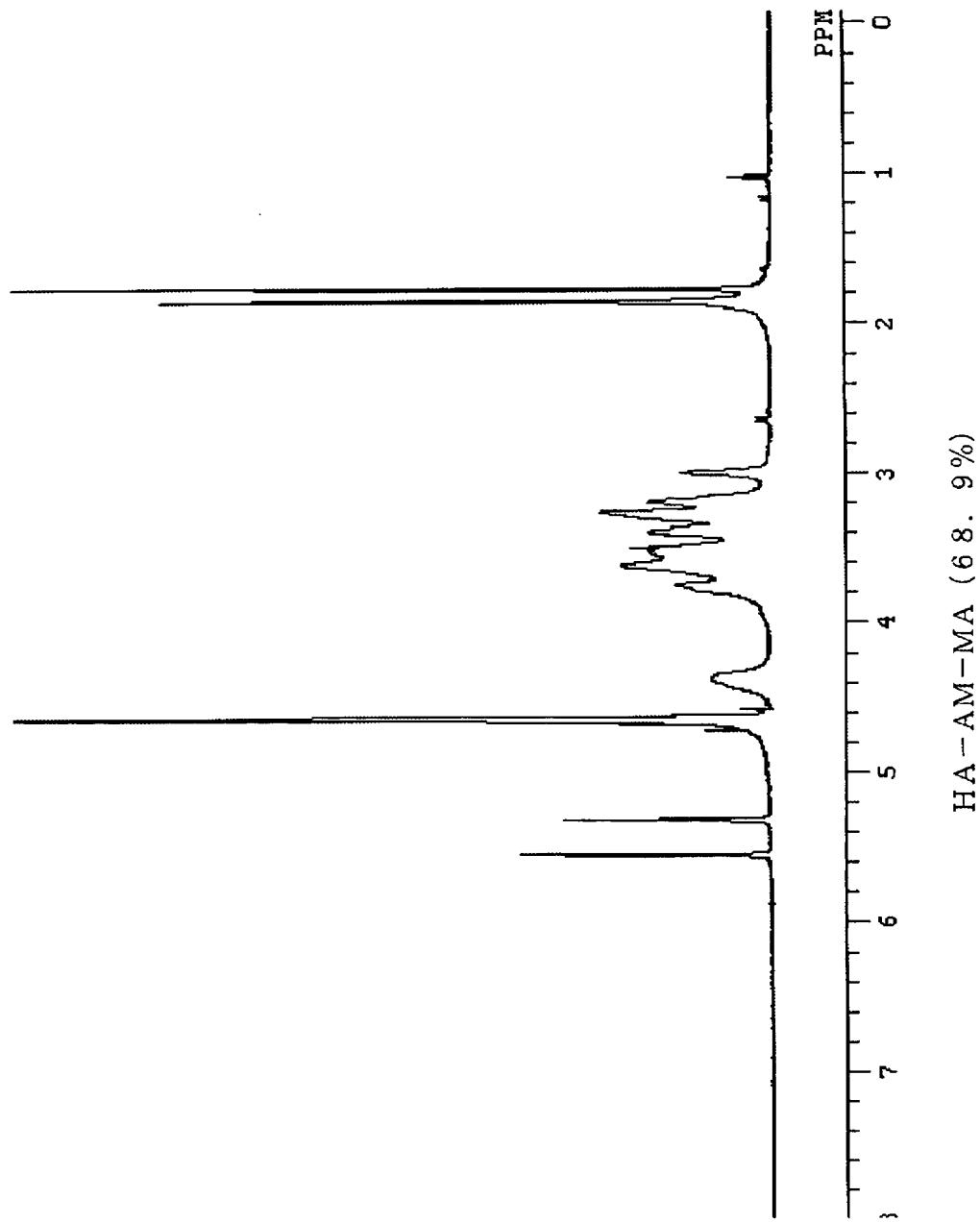
[図9]



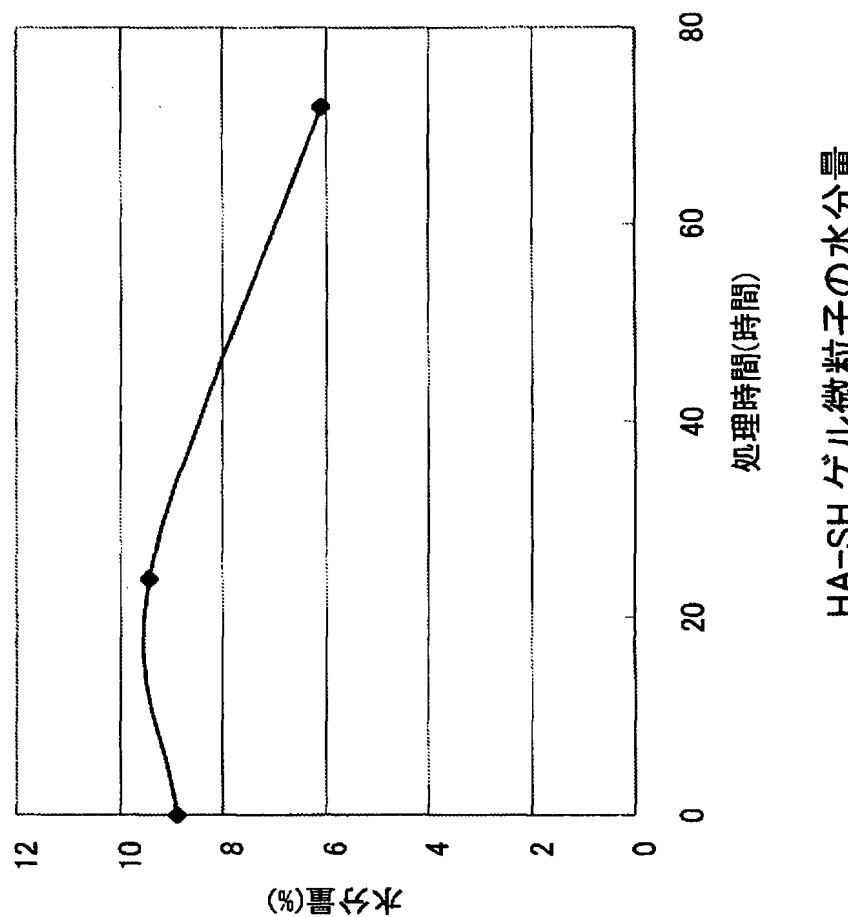
[図10]



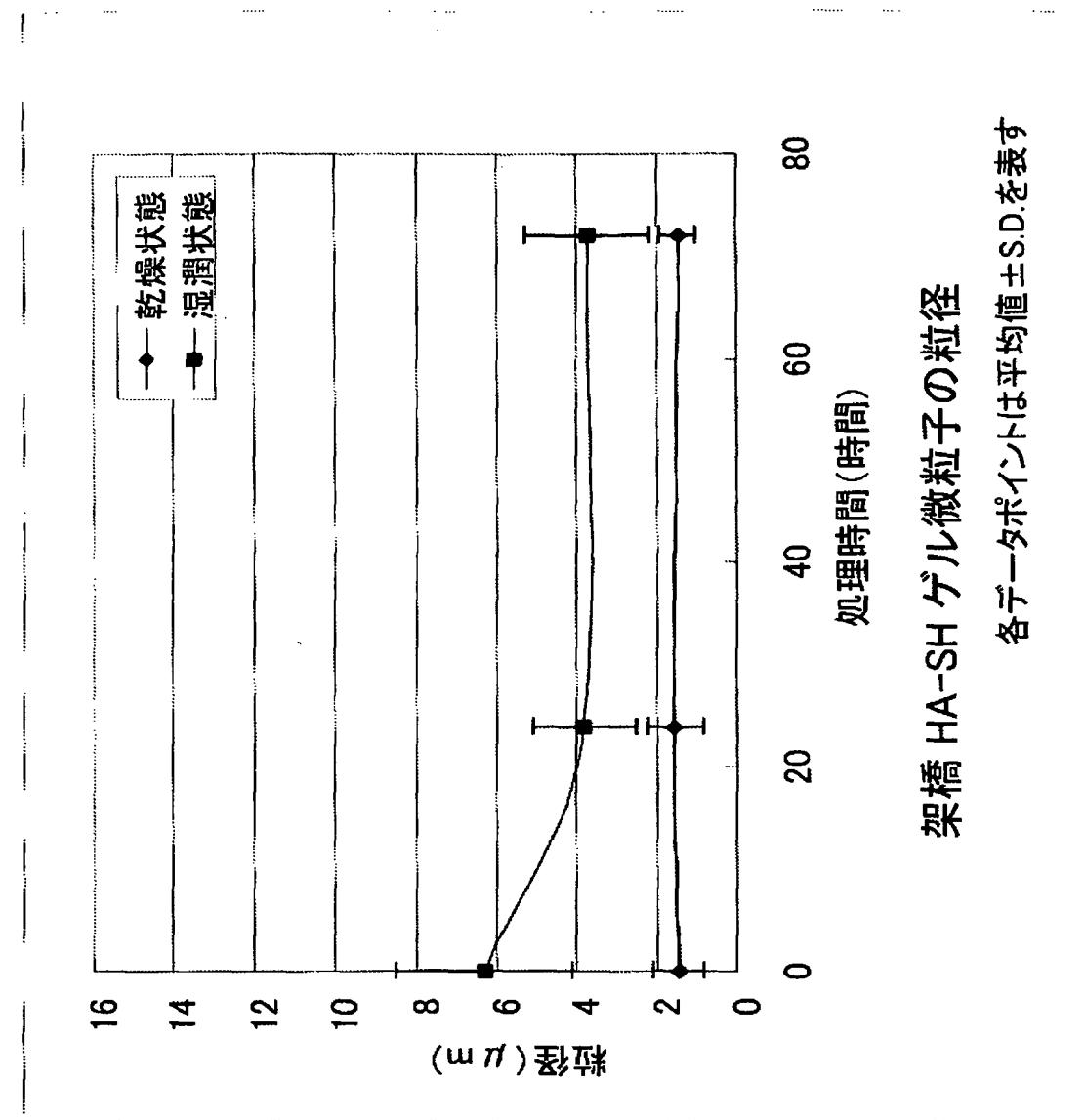
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016948

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C08B37/08, A61K47/36, 9/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C08B37/00-37/18, A61K47/36, 9/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-514316 A (BIOTECH AUSTRALIA PTY. LTD.), 11 September, 2001 (11.09.01), Full text	1,2,4-9, 12-20,22
Y	& EP 1012208 A1 & CA 2302523 A	3
Y	& WO 1999/011703 A1 & US 6221397 B1	1-8,12-19
	JP 11-513047 A (LG Chemical Ltd.), 09 November, 1999 (09.11.99), Full text	
	& EP 918535 A1 & CA 2256596 A	
	& WO 1998/043664 A1 & US 2002/197328 A1	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 March, 2005 (15.03.05)Date of mailing of the international search report
05 April, 2005 (05.04.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2004/016948
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-510100 A (WEST PHARMACEUTICAL SERVICES DRUG DELIVERY & CLINICAL RESEARCH CENTRE LTD.), 08 August, 2000 (08.08.00), Full text & EP 895473 A1 & WO 1997/035562 A1 & CA 2250053 A & US 2001/007665 A1	1-8, 12-19 3
Y	JP 11-509256 A (Kyu Medo AB), 17 August, 1999 (17.08.99), Full text & EP 839159 A1 & WO 1997/004012 A1 & CA 2226488 A & US 5827937 A	1-8, 12-19
A	JP 9-59303 A (Shiseido Co., Ltd.), 04 March, 1997 (04.03.97), Full text (Family: none)	1-22
A	JP 10-509696 A (Focal, Inc.), 22 September, 1998 (22.09.98), Full text & EP 785774 A1 & WO 1996/011671 A1 & CA 2202511 A & US 587913 A	1-22
A	JP 2000-248002 A (Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 12 September, 2000 (12.09.00), Full text (Family: none)	1-22
A	JP 11-319066 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 24 November, 1999 (24.11.99), Full text (Family: none)	1-22
A	JP 11-193246 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 21 July, 1999 (21.07.99), Full text & WO 1998/052605 A1 & CA 2290696 A	1-22

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C17 C08B37/08, A61K47/36, 9/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C17 C08B37/00-37/18, A61K47/36, 9/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2001-514316 A(バイオテック・オーストラリア・ピーティーウィ・リミテッド) 2001.09.11, 全文 & EP 1012208 A1 & WO 1999/011703 A1 & CA 2302523 A & US 6221397 B1	1, 2, 4-9, 12- 20, 22 3
Y	JP 11-513047 A(株式会社エルジ化学) 1999.11.09, 全文 & EP 91853 5 A1 & WO 1998/043664 A1 & CA 2256596 A & US 2002/197328 A1	1-8, 12-19
X	JP 2000-510100 A(ウェスト、フルマシューティカル、サービシズ、ドラッグ、デリバリー、アン ド、クリニック、リサーチ、センター、リミテッド) 2000.08.08, 全文 & EP 895473 A1 & WO 1997/035562 A1 & CA 2250053 A & US 2001/007665 A1	1-8, 12-19 3

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 15. 03. 2005	国際調査報告の発送日 05. 4. 2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 關 政立 4C 8619 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	JP 11-509256 A(キュー・メト・アクチエボーラーク) 1999.08.17, 全文 & EP 839159 A1 & WO 1997/004012 A1 & CA 2226488 A & US 5827937 A	1-8, 12-19
A	JP 9-59303 A(株式会社資生堂) 1997.03.04, 全文(ファミリーなし)	1-22
A	JP 10-509696 A(フォーカル、インコーポレーテッド) 1998.09.22, 全文 & EP 785774 A1 & WO 1996/011671 A1 & CA 2202511 A & US 5879713 A	1-22
A	JP 2000-248002 A(電気化学工業株式会社) 2000.09.12, 全文 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 11-319066 A(三菱化学株式会社) 1999.11.24, 全文 (ファミリーなし)	1-22
A	JP 11-193246 A(住友製薬株式会社) 1999.07.21, 全文 & WO 1998/052605 A1 & CA 2290696 A	1-22